

# Best Available Copy

1/5/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI  
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

008929601

WPI Acc No: 1992-056870/\*199207\*

Related WPI Acc No: 1992-025485

XRAM Acc No: C92-025709

O-glycosylated alpha interferon - used for treatment of viral and tumour diseases

Patent Assignee: BOEHRINGER INGELHEIM INT GMBH (BOEH )

Inventor: ADOLF G; AHORN H J; HIMMLER A; KALSNER I; MAURER-FOGY I; AHORN H; MAURERFOGY I

Number of Countries: 026 Number of Patents: 014

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week	
WO 9201055	A	19920123				199207	B
AU 9182082	A	19920204	AU 9182082	A	19910706	199220	
			WO 91EP1266	A	19910706		
DE 4035877	A	19920514	DE 4035877	A	19901112	199221	
FI 9300058	A	19930108	WO 91EP1266	A	19910706	199314	
			FI 9358	A	19930108		
EP 538300	A1	19930428	EP 91912306	A	19910706	199317	
			WO 91EP1266	A	19910706		
NO 9300059	A	19930108	WO 91EP1266	A	19910706	199317	
			NO 9359	A	19930108		
CS 9203863	A2	19930811	CS 923863	A	19921223	199344	
EP 538300	B1	19940413	EP 91912306	A	19910706	199415	
			WO 91EP1266	A	19910706		
JP 6502987	W	19940407	JP 91511638	A	19910706	199419	
			WO 91EP1266	A	19910706		
DE 59101397	G	19940519	DE 501397	A	19910706	199421	
			EP 91912306	A	19910706		
			WO 91EP1266	A	19910706		
AU 650893	B	19940707	AU 9182082	A	19910706	199431	
HU 65846	T	19940728	WO 91EP1266	A	19910706	199431	
			HU 9336	A	19910706		
SK 9203863	A3	19940810	SK 923863	A	19921223	199436	
			WO 91EP1266	A	19910000		
ES 2063515	T3	19950101	EP 91912306	A	19910706	199508	

Priority Applications (No Type Date): DE 4035877 A 19901112; DE 4021917 A 19900710

Cited Patents: 5.Jnl.Ref; DE 3306060; EP 158420; US 4289690; WO 8300693

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

WO 9201055	A				
		Designated States (National): AU CA CS FI HU JP KR NO PL SU US			
		Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LU NL SE			
AU 9182082	A	C12N-015/21	Based on patent WO 9201055		
DE 4035877	A	19 C07K-015/26			
EP 538300	A1 G	C12N-015/21	Based on patent WO 9201055		
		Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE			
EP 538300	B1 G	58 C12N-015/21	Based on patent WO 9201055		
		Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE			
JP 6502987	W	23 C12N-015/21	Based on patent WO 9201055		

DE 59101397	G	C12N-015/21	Based on patent EP 538300 Based on patent WO 9201055
AU 650893	B	C07K-013/00	Previous Publ. patent AU 9182082 Based on patent WO 9201055
HU 65846	T	C12N-015/21	Based on patent WO 9201055
ES 2063515	T3	C12N-015/21	Based on patent EP 538300
FI 9300058	A	C12N-000/00	
NO 9300059	A	C12N-015/21	
CS 9203863	A2	C12N-015/21	
SK 9203863	A3	C12N-015/21	

Abstract (Basic): WO 9201055 A

Alpha-interferon (IFNalpha) which is O-glycosylated and has the biological and/or immunological properties of IFN alpha(2) is new.

Specified are O-glycosylated IFNalpha-2a, -2b and -2c.

More specifically, the prod. is glycosylated at Thr-106, esp. by Gal-GalNAc (including its mono- or di-silylated derivs.) or Gal-(Gal-GlcNAc)-GalNAc.

USE - The glycosylated IFN's are used (partic. as a mixt. of at least 2 of the alpha-2a, -2b or -2c forms) for treatment of viral and tumour diseases.

Dwg.0/24

Title Terms: GLYCOSYLATED; ALPHA; INTERFERON; TREAT; VIRUS; TUMOUR; DISEASE

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C07K-013/00; C07K-015/26; C12N-015/21

International Patent Class (Additional): A61K-037/66; C12P-021/02;

C12P-021/08

File Segment: CPI



+ BENENNUNGEN VON "SU"

Es wird zur Zeit geprüft, in welchen Teilen der ehemaligen Sowjetunion die Benennung der Sowjetunion ihre Wirkung ausübt.

*LEDIGLICH ZUR INFORMATION*

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MN	Mongolei
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BJ	Benin	GR	Griechenland	PL	Polen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

### O-glycosyliertes IFN-alpha

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind O-glycosylierte alpha Interferone, vorzugsweise ein Interferon alpha, im wesentlichen mit den biologischen und/oder immunologischen Eigenschaften eines IFN- $\alpha$ 2, Verfahren zu dessen Herstellung sowie die Verwendung der O-glycosylierten Interferone als Arzneimittel.

Seit der Entdeckung der Interferone vor mehr als dreißig Jahren werden ihre biologischen Eigenschaften als Mediatoren der interzellulären Kommunikation intensiv untersucht. Ursprünglich wurde die Bezeichnung der verschiedenen Arten von der jeweiligen Zelle, in der sie entstanden sind, abgeleitet (z.B. Leukocyten-IFN, Fibroblasten-IFN). Mit zunehmender Kenntnis ihrer Struktur wurde eine neue Nomenklatur eingeführt. Man unterscheidet zur Zeit vier Arten von Interferonen (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  und IFN- $\omega$ ), wobei IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und IFN- $\omega$  zu den sogenannten "Klasse 1 Interferonen" zusammengefaßt werden, da sie ähnliche Strukturen und Eigenschaften aufweisen.

IFN- $\gamma$  wird von Lymphozyten, die durch Antigene oder mitogene Substanzen stimuliert werden, gebildet. Die Aminosäuresequenz, die keine Homologie zu den Klasse 1 Interferonen aufweist, enthält zwei potentielle N-Glycosylierungsstellen.

IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und IFN- $\omega$  werden von verschiedenen Zellen als Reaktion auf Virusinfektion oder nach Induktion mit doppelsträngiger RNA synthetisiert.

Bei IFN- $\alpha$  handelt es sich eigentlich um eine ganze Gruppe von Proteinen. Bisher wurden mindestens 14 funktionelle Gene entdeckt, die für verschiedene

IFN- $\alpha$ -Typen kodieren. Diese Proteine sind nahe verwandt und weisen zumeist etwa 80-90% Homologie in ihrer Aminosäuresequenz auf. Mit Ausnahme von IFN- $\alpha$ 14 ist in keiner der übrigen IFN- $\alpha$ - Aminosäuresequenzen eine N-Glycosylierungsstelle (ASN-X-SER/THR) vorhanden. N-Glycosylierung ist somit in allen Fällen (außer IFN- $\alpha$ 14) auszuschließen, jedoch wurde O-Glycosylierung von IFN- $\alpha$  diskutiert (Labdon et al., Arch. Biochem. Biophys. 232, 422-426 (1984))

Viele in der Natur vorkommende Proteine werden posttranslational modifiziert, wobei Glycosylierung eine der häufigsten Modifikationen ist. Glycoproteine kommen membrangebunden oder löslich sowohl in der intra- als auch extrazellulären Matrix vor. Über die Funktion der Glycosylierung gibt es unterschiedliche Auffassungen. Gesichert ist, daß Glycane die Proteine vor proteolytischem Abbau schützen können oder daß sie in vielen Fällen für Zell-Zell-Wechselwirkungen verantwortlich sind. Weiterhin beeinflussen sie die Proteinfaltung und tragen zur Stabilität der Konformation des Moleküls bei. Auch die Löslichkeit der Proteine unterliegt dem Einfluß der Kohlenhydratketten.

Man unterscheidet zwischen N- und O-glycosylierten Proteinen. N-Glycane werden ausschließlich auf das ASN des Triplets -ASN-X-SER/THR- übertragen, wobei X jede beliebige Aminosäure mit Ausnahme von PRO oder GLU sein kann. Diese Anforderung an die Struktur des Proteins kann aber nur eine von mehreren sein, da nicht alle potentiellen Glycosylierungsstellen mit einem Kohlenhydrat besetzt sind. Für O-Glycane gibt es keine genau definierten Strukturmerkmale. Es gibt allerdings Hinweise darauf, daß O-Glycane bevorzugt in PRO-, SER- und THR-reichen Regionen synthetisiert werden. Das läßt vermuten, daß eher die sterische Zugänglichkeit der

Glycosylierungsstelle als eine bestimmte Aminosäuresequenz für die O-Glycosylierung bedeutend ist. Einflüsse der Glycosylierung auf die Pharmakokinetik sowie auf die immunologischen Eigenschaften des Proteins können nicht ausgeschlossen werden. So wurde kürzlich darüber berichtet (Gibbon et al., Lancet, 335, 434-437 (1990), daß 4 von 16 Patienten, die mit rekombinantem humanem GM-CSF (granulocyte-macrophage-colony stimulating factor), der in Hefe produziert worden war, behandelt worden waren, Antikörper gegen dieses Protein entwickelten. Man stellte fest, daß diese Antikörper mit Epitopen reagierten, die in endogenem GM-CSF durch O-Glycosylierung geschützt vorliegen, im rekombinanten Faktor jedoch frei zugänglich sind.

Im IFN- $\alpha$ 2 konnten bislang weder Kohlenhydratanteile nachgewiesen, noch konnte O-glycosyliertes IFN- $\alpha$  isoliert werden. Verschiedene Präparationen von natürlichem IFN- $\alpha$  und von rekombinantem IFN- $\alpha$ 2 sind als Medikamente gegen virale und Krebserkrankungen im Einsatz. Da dieses IFN- $\alpha$ 2 in *E. coli* produziert wird und daher nicht glycosyliert sein kann, scheint der Kohlenhydratanteil für die in vivo biologische Aktivität nicht bedeutend zu sein. In letzter Zeit mehren sich jedoch Berichte, daß Patienten, die längere Zeit mit rekombinantem, in *E. coli* produziertem IFN- $\alpha$ 2 behandelt wurden, Antikörper dagegen entwickelten (z.B. Figlin & Itri, Semin. Haematol. 25, 9-15 (1988)).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war, ein neues IFN- $\alpha$ 2 bereitzustellen.

Gelöst wurde diese Aufgabe durch die Insertion der für IFN- $\alpha$ 2 kodierenden DNA Sequenz in einen speziellen Expressionsvektor, mit dem Zellen multizellulärer

Organismen transfiziert wurden. Nach Kultivierung dieser so modifizierten Zellen erhielt man überraschenderweise IFN- $\alpha$ 2-artige Proteine, die sich im Molekulargewicht eindeutig von dem bekannten rekombinanten IFN $\alpha$ 2 unterschieden.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen, neuen Interferone eignen sich Kulturen von Zellen multizellulärer Organismen, insbesondere Kulturen von Wirbeltierzellen oder von Insektenzellen. Als Beispiele von Wirbeltierzelllinien sind VERO-Zellen, HeLa-Zellen, CHO-Zellen, WI38-Zellen, BHK-Zellen, COS-7-Zellen, MDCK-Zellen oder Maus-Myelomzellen zu nennen. Expressionsvektoren für diese Zellen enthalten wenn nötig eine Replikationsstelle, einen Promotor, falls erforderlich eine RNA-Splicing-Stelle, eine Polyadenylierungsstelle und transkriptionelle Terminations-Sequenzen. Die Kontrollfunktionen solcher Expressionsvektoren stammen üblicherweise aus viralem Material. Gebräuchliche Promotoren stammen aus Polyoma, Adenovirus 2, Simian Virus 40 (SV40), bevorzugt aus Cytomegalovirus (CMV). Die erforderliche Replikationsstelle kann entweder durch eine entsprechende Vektorkonstruktion vorgesehen werden, so beispielsweise die Replikationsstelle aus SV40, Polyoma, Adeno, VSV, oder PBV oder kann durch die chromosomalen Replikationsmechanismen der Wirtszelle vorgesehen werden. Bei Integration des Vektors in das Wirtszellenchromosom reicht die letztgenannte Maßnahme aus.

Erfindungsgemäß werden vorzugsweise Expressionsvektoren verwendet, die aus Teilen von Plasmiden neu konstruiert wurden. Diese erfindungsgemäßen Expressionsvektoren weisen eine Multiklonierstelle für die gerichtete Insertion heterologer DNA-Sequenzen auf und lassen sich

vorzugsweise in *E. coli* mittels Ampicillinresistenz mit hoher Kopienzahl vermehren. Um die Expression heterologer Gene in Säugetierzellen zu ermöglichen, enthalten die erfindungsgemäßen Expressionsplasmide vorzugsweise den Cytomegalovirus (CMV) Promotor/Enhancer (M. Boshart et al., Cell 41, (1985), 521-530). Um die autonome Replikation der erfindungsgemäßen Expressionsplasmide zu hohen Kopienzahlen und damit hohe Raten in transienter Expression in geeigneten Zelllinien wie beispielsweise in COS-7 oder in der mit Adenovirus transformierten Zelllinie 293 (ATCC CRL 1573), zu ermöglichen, wurde der SV40 Replikationsursprung verwendet. Zur Herstellung permanent transformierter Zelllinien und zur nachfolgenden Amplifikation der Expressionskassette mittels Methotrexat dient ein modifiziertes Hamster Minigen (Promotor mit kodierendem Bereich und dem ersten Intron) für Dihydrofolatreduktase (DHFR) als Selektionsmarker. Um die Herstellung einzelsträngiger Plasmid-DNA nach Superinfektion der transformierten Bakterien mit einem Helferphagen, beispielsweise mit R408 oder M13KO7, zur erleichterten Sequenzierung und Mutagenese der Plasmid-DNA zu ermöglichen, enthielten vorzugsweise Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Plasmide die intergenische Region von M13. Wird in einer weiteren vorzugsweisen Ausgestaltung der T7 Promotor der Multiklonierstelle vorangestellt, wird dadurch die Herstellung von RNA Transkripten *in vitro* ermöglicht.

Erfindungsgemäß bevorzugt sind die Expressionsplasmide pAD-CMV13, pAD-CMV15 insbesondere pAD-CMV19. Ihre Herstellung ist in Beispiel 1 ausführlich beschrieben.

Zur Erzielung einer verbesserten Expression und zur Erleichterung einer gerichteten Klonierung der für

IFN- $\alpha$ 2 kodierenden cDNA wurde die für IFN- $\alpha$ 2 kodierende cDNA mittels PCR in der 5'-nicht kodierenden Region erfindungsgemäß dahingehend modifiziert, daß die Sequenz dieser Region gegen die Sequenz der 5'-nicht kodierenden Region der humanen  $\beta$ -Globin mRNA (Lawn et al., Cell 21, (1980), 647-651) ausgetauscht wird. Gleichzeitig wurden an beiden Enden der cDNA Restriktionsenzymeschnittstellen eingeführt, die eine gerichtete Klonierung erleichtern. Überraschenderweise bewirkt eine derartige Veränderung eine deutliche Erhöhung der Expression.

Die so modifizierte cDNA für IFN- $\alpha$ 2 wurde in ein mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittenes erfindungsgemäßes Expressionsplasmid, vorzugsweise in das Plasmid pAD-CMV19 inseriert. Mit den so erhaltenen Expressionsplasmiden für IFN- $\alpha$ 2 wurden geeignete Säugetierzellen transfektiert, die daraufhin in einem geeigneten Kulturmedium kultiviert wurden. Der Kulturüberstand der Säugetierzellen wurde in an sich bekannter Weise unter schonenden Bedingungen gereinigt. Vorzugsweise verwendet man affinitätschromatographische Reinigungsverfahren mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen IFN- $\alpha$ 2. Bevorzugte monoklonale Antikörper sind EBI-1 oder EBI-10 beziehungsweise deren Äquivalente. Die Herstellung dieser hochspezifischen Antikörper ist beschrieben (Adolf G.R. J. Gen. Virol. 68, 1669-1676 (1987); Adolf et al. J. Cell. Physiol. suppl. 2, 61-68 (1982)). Die zu verwendenden Methoden sind ebenfalls beschrieben (Secher und Burke, Nature 285, 446-450 (1980); Adolf et al., J. Biol. Chem. 265, 9290-9295 (1990); Adolf et al., Biochem. J. 276, 511-518 (1991)). Besonders vorteilhaft ist das Reinigungsverfahren gemäß EPA 0 203 382 zu verwenden, wobei auf das Aufbrechen der Zellen verzichtet werden kann. Zur Charakterisierung von rekombinantem, in Säugetierzellen

herstelltem IFN- $\alpha$ 2 wurde die Reverse Phase HPLC verwendet. Der N-Terminus und C-Terminus wurden analysiert. Zum Vergleich wurde jeweils rekombinantes, in *E. coli* herstelltes IFN- $\alpha$ 2c verwendet. Anhand SDS-Gelelektrophoretischer Untersuchungen war festzustellen, daß das in Säugetierzellen herstellte rekombinante IFN- $\alpha$ 2 ein höheres Molekulargewicht aufwies, als das in *E. coli* herstellte IFN- $\alpha$ 2. Nach Behandlung beider rekombinanter Interferone mit NaOH reduzierte sich das Molekulargewicht des in Säugetierzellen herstellten, rekombinanten IFN- $\alpha$ 2's auf das Molekulargewicht des in *E. coli* herstellten IFN- $\alpha$ 2's. In Säugetierzellen exprimiertes, rekombinantes IFN- $\alpha$ 2 muß daher glycosyliert sein. Bei der Identifizierung der Glycopeptide mittels Peptide Mapping und Sequenzanalyse konnte festgestellt werden, daß das an Position 106 befindliche Threonin (THR-106) die Glycosylierung trägt. Bei einem Vergleich der Resultate mit denen, die beim natürlichen IFN- $\alpha$ 2 aus virusstimulierten Leukocyten erhalten wurden (s. unten) zeigte es sich, daß sowohl die Glycosylierungsstelle als auch der Oligosaccharidanteil weitgehend identisch sind.

Gelöst wurde die erfindungsgemäße Aufgabe aber auch durch ein Reinigungsverfahren, das keine Verfahrensschritte enthält, die evtl. vorhandene Substitutionen des IFN- $\alpha$ 2 verändern oder eliminieren. Das erfindungsgemäße Reinigungsverfahren bediente sich hochspezifischer monoklonaler Antikörper, wobei während des gesamten Reinigungsverfahrens alkalische Bedingungen mit einem pH-Wert größer als 8,0 sorgsam vermieden wurden.

Natürliches humanes IFN- $\alpha$ 2 wurde mit Hilfe eines hochspezifischen monoklonalen Antikörpers aus

Leukozyteninterferon isoliert. Zwei aufeinanderfolgende Reinigungsschritte über eine Immunoaffinitätssäule führten zu einer Reinheit des Proteins von >95%. Die Sequenzanalyse ergab die erwartete N-terminale Sequenz, wobei CYS als erste Aminosäure nur indirekt nachgewiesen wurde.

Von IFN- $\alpha$ 2 sind bisher drei Varianten, die sich in den Aminosäuren an den Positionen 23 und 34 unterscheiden, bekannt: IFN- $\alpha$ 2a mit  $^{23}$ LYS und  $^{34}$ HIS (früher als Le IFN bezeichnet; Goeddel et al., *Nature*, 290, 20-26 (1981)), IFN- $\alpha$ 2b mit  $^{23}$ ARG und  $^{34}$ HIS (Streuli et al., *Science*, 209, 1343-1347 (1980)) und IFN- $\alpha$ 2c mit  $^{23}$ ARG und  $^{34}$ ARG (früher als IFN- $\alpha$ 2"Arg" bezeichnet; Dworkin-Rastl et al., *J. Interferon Res.*-2, 575-585 (1982); Bodo & Maurer-Fogy, *The Biology of the Interferon System* 1985 (Stewart II, W.E. & Schellehus H. Hrsg.) 59-64 (1986). Bei dem isolierten Interferon konnte an Position 23 nur ARG nachgewiesen werden, was das Vorhandensein von IFN- $\alpha$ 2a ausschließt. Die Aminosäure an Position 34 war eindeutig Histidin, so daß es sich bei dem isolierten Interferon um IFN- $\alpha$ 2b handelte. Ebenso sind jedoch auch die Varianten IFN- $\alpha$ 2a bzw. IFN- $\alpha$ 2c erhältlich je nachdem, welches Zellmaterial als Ausgangsmaterial verwendet wird. Es ist bekannt, daß in Namalwa-Zellen neben IFN- $\alpha$ 2b auch IFN- $\alpha$ 2c zu finden ist. Bei dem als Vergleichssubstanz verwendeten rekombinanten Interferon aus *E. coli* handelte es sich um IFN- $\alpha$ 2c.

RP-HPLC-Analysen des gereinigten natürlichen IFN- $\alpha$ 2 zeigten, daß die Präparation zwei Peaks enthielt, die beide früher von der Säule eluierten als das rekombinante *E. coli*-IFN- $\alpha$ 2c. Auch mittels SDS-PAGE konnte eine starke Heterogenität in der scheinbaren

molekularen Masse von natürlichem IFN- $\alpha$ 2 nachgewiesen werden. Alle in natürlichem IFN- $\alpha$ 2 nachgewiesenen Proteine hatten eine wesentlich höhere scheinbare molekulare Masse als rekombinantes IFN- $\alpha$ 2c aus *E. coli*. Sämtliche bisher beschriebene IFN- $\alpha$ -Spezies - mit Ausnahme von IFN- $\alpha$ 14 - weisen keine N-Glycosylierungsstelle (-ASN-X-THR/SER-) auf. Somit kann auch für IFN- $\alpha$ 2 N-Glycosylierung ausgeschlossen werden. Für O-Glycane kennt man solche Strukturmerkmale nicht. Nicht auszuschließen ist daher, daß das vorliegende IFN- $\alpha$ 2 O-glycosyliert ist.

Da O-Glycane schon unter schwach alkalischen Bedingungen vom Protein abgespalten werden können, wurden beide Peakfraktionen schwach alkalischen Bedingungen unterworfen. Diese Reaktion führte in beiden Fällen zu einer Reduktion der scheinbaren molekularen Masse auf die des rekombinanten IFN- $\alpha$ 2c aus *E. coli*; ein deutlicher Hinweis auf O-Glycosylierung.

Versuche mit Neuraminidase und O-Glycanase ergaben für den einen Peak (Peak 2) (s. Fig. 14) ebenfalls eine Reduktion der scheinbaren molekularen Masse auf jene von *E. coli*-IFN- $\alpha$ 2c und bestätigten damit die O-Glycosylierung. Die Ergebnisse dieses sequentiellen Abbaus des Glycans mit Neuraminidase und O-Glycanase zeigten, daß die Heterogenität des Peak 2 auf dem unterschiedlichen Gehalt von N-Acetylneuraminsäure (NeuAc = Sialinsäure) beruhte. Die drei Banden (Fig. 20, Spur 4) repräsentierten die di- bzw. monosialylierte (Mr 21.000 bzw. 20.000) und die nichtsialylierte (Mr 19.000) Form des natürlichen IFN- $\alpha$ 2. Die leichteste Form des IFN- $\alpha$ 2 konnte durch Reaktion mit O-Glycanase allein abgebaut werden. Da O-Glycanase nur das unsubstituierte Disaccharid

Gal(β1-3)GalNAc spaltet, ist die Reaktion als Beweis dafür anzusehen, daß neben den beiden sialylierten Formen auch eine Asialo-Variante des IFN- $\alpha$ 2 existiert.

Die scheinbare molekulare Masse von Peak 1 hingegen konnte mittels Enzymreaktionen nicht reduziert werden. Inkubation mit Neuraminidase führte nicht wie erwartet zu einer Reduktion der scheinbaren molekularen Masse. Das Disaccharid-Core mußte demnach anders als mit NeuAc substituiert sein und konnte daher nicht durch O-Glycanase abgespalten werden.

Durch Vergleich der Peptide Maps nach Trypsinspaltung von natürlichem und rekombinantem, in *E. coli* exprimiertem IFN- $\alpha$ 2 konnten die Glycopeptide aus den Peaks 1 und 2 identifiziert werden. Die Sequenzierung dieser Glycopeptide ergab <sup>106</sup>THR als Glycosylierungsstelle.

Hinweise auf die Struktur der Oligosaccharide des natürlichen IFN- $\alpha$ 2 gaben neben den Enzymreaktionen auch massenspektrometrische Untersuchungen der Glycopeptide. Die Interpretation der Massenspektren zusammen mit den Ergebnissen der SDS-PAGE ergaben, daß natürliches IFN- $\alpha$ 2 zumindest vier verschiedene Glycanstrukturen enthält: im Peak 2 das neutrale Disaccharid Gal(β1-3)GalNAc, dessen Struktur aufgrund der hohen Spezifität der O-Glycanase mit großer Sicherheit anzunehmen ist, außerdem die mono- und die disialylierte Variante; im Peak 1 ein neutrales Oligosaccharid, bestehend aus zwei Hexose- und zwei N-Acetylhexosamin-Einheiten. Als Struktur dieses Tetrasaccharides kann in Analogie zu bereits beschriebenen häufiger vorkommenden O-Glycanen vorgeschlagen werden: Gal-(Gal-GlcNAc-)GalNAc.

Durch die vorliegende Erfindung konnte überraschenderweise erstmals O-glycosyierte IFN- $\alpha$ 2 in hochreiner Form bereitgestellt werden. Dieses Interferon ist an der Aminosäure Threonin an Position 106 ( $^{106}$ THR) O-glycosyliert. Die Oligosaccharide, die an dieser Position enthalten sein können, sind das neutrale Disaccharid Gal(β1-3)GalNAc, dessen mono- und disialylierte Varianten sowie ein neutrales Tetrasaccharid Gal-(Gal-GlcNAc-)GalNAc.

Dieses O-glycosylierte IFN- $\alpha$ 2 kann in an sich bekannter Weise, in Analogie zum rekombinanten in E. coli exprimierten IFN- $\alpha$ 2, formuliert und in allen, für IFN- $\alpha$  bekannten Indikationen zur Behandlung eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Proteine können für die Behandlung der viralen Infektionen und von malignen Erkrankungen in der Form von pharmazeutischen Präparaten verwendet werden, die eine wirksame Menge des IFN's gegebenenfalls zusammen mit einer signifikanten Menge eines anorganischen oder organischen, festen oder flüssigen, pharmazeutisch verwendbaren Trägerstoffes enthalten.

Bevorzugt sind pharmazeutische Präparate zur parenteralen, beispielsweise intramuskulären, subkutanen oder intravenösen Verabreichung am Menschen. Solche Präparate sind isotonische wässrige Lösungen oder Suspensionen, die die erfindungsgemäßen Proteine enthalten, gegebenenfalls zusammen mit einem Trägermaterial und, wenn erwünscht, Hilfsmittel, beispielsweise Stabilisatoren, Emulgiermittel, lösungsvermittelnde Stoffe, Salze für die Regulierung des pH und des osmotischen Druckes, Konserviermittel und/oder Netzmittel. Die pharmazeutischen Präparationen

können nach an sich bekannten Methoden hergestellt werden, beispielsweise in einem Verfahren, worin die erfindungsgemäßen Proteine und die pharmazeutisch verwendbaren Träger und Hilfsstoffe gemischt, gewünschtenfalls lyophilisiert und vor Verwendung gelöst werden.

Die Dosierung der pharmazeutischen Präparate hängt von der zu behandelnden Krankheit, dem Körpergewicht, Alter und individuellen Zustand des Patienten gemäss Einschätzung des behandelnden Arztes und der Applikationsweise ab.

Durch die vorliegende Erfindung wird daher erstmals ein O-glycosyliertes Interferon- $\alpha$ 2 enthaltendes Mittel bereitgestellt, das aufgrund der antiviralen und antineoplastischen Eigenschaften des IFN- $\alpha$ 2 u.a. zur Behandlung von viralen und tumoralen Erkrankungen geeignet ist.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung erläutern ohne sie einzuschränken.

#### Legenden zu den Figuren

Fig. 1: Konstruktion des Plasmides pCMV+SV40

Fig. 2: Konstruktion des Plasmides pAD-CMV10A

Fig. 3: Konstruktion des Plasmides pAD-CMV15

Fig. 4: Konstruktion der Plasmide pAD-CMV13 und pAD-CMV19

Fig. 5: Konstruktion des Expressionsplasmides pAD 19B-IFN

Fig. 6: HindIII/XbaI-Insert des Expressionsplasmides pAD19B-IFN

Fig. 7: DNA-Sequenz des Plasmides pAD-CMV19

Fig. 8: Konstruktion des Plasmides pCMV-SV40

Fig. 9: Konstruktion des Plasmides pSV2gptDHFRMut2

Fig. 10: Konstruktion der Plasmide pAD-CMV1 und pAD-CMV2

Fig. 11: DNA-Sequenz des Plasmides pAD-CMV1

Fig. 12: Monoklonale Antikörper Affinitätschromatographie des humanen Leukozyten Interferons

Fig. 13: ELISA für human IFN- $\alpha$ :  
(O) Referenzpräparation des rekombinanten human IFN- $\alpha$ 2c; (O) Leukozyteninterferon (Ausgangsmaterial) (□) Durchfluß (□) eine Fraktion des Eluates A; ( $\Delta$ ) eine Fraktion des Eluates B

Fig. 14: RP-HPLC des natürlichen IFN- $\alpha$ 2 (b) und E. coli IFN- $\alpha$ 2c (a)

Fig. 15: Aminosäuresequenz des IFN- $\alpha$ 2c

Fig. 16: SDS-PAGE von natürlichem IFN- $\alpha$ 2 vor und nach Reaktion mit Neuraminidase und O-Glycanase. (1) Peak 1, unbehandelt; (2) Peak 1, nach Reaktion mit Neuraminidase; (3) Peak 1, nach Reaktion mit Neuraminidase

und O-Glycanase; (4) Peak 2, unbehandelt; (5) Peak 2, nach Reaktion mit Neuraminidase; (6) Peak 2, nach Reaktion mit Neuraminidase und O-Glycanase; (7) E. coli-IFN- $\alpha$ 2c

Fig. 17: SDS-PAGE von natürlichem IFN- $\alpha$ 2 (Peak 2 aus Fig. 14b) vor (1) und nach (2) Reaktion mit O-Glycanase.

Fig. 18: SDS-PAGE von natürlichem IFN- $\alpha$ 2 (Peak 1 und 2) und E. coli-IFN- $\alpha$ 2c nach Inkubation mit 0.1 M NaOH. (1) E. coli-IFN- $\alpha$ 2; (3) Peak 1; (5) Peak 2; unbehandelte Vergleichsproben von Peak 1 (2) und von Peak 2 (4) wurden ebenfalls aufgetragen.

Fig. 19: Vergleichendes Peptide Map von E. coli-IFN- $\alpha$ 2c und natürlichem IFN- $\alpha$ 2. (1) Peak 1 aus Fig. 14b; (2) Peak 2 aus Fig. 14b; \*, diese Peaks stammen von unglycosylierten Peptiden, deren Retentionszeit immer gleich war.

Fig. 20: SDS-PAGE von natürlichem IFN $\alpha$ 2 und E. coli-IFN $\alpha$ 2c. (1) Molekulargewichtsmarker; (2) E. coli-IFN $\alpha$ 2c; (3) natürliches IFN- $\alpha$ 2, Peak 1 aus Fig. 14b; (4) natürliches IFN- $\alpha$ 2, Peak 2 aus Fig. 14b; Färbung: Coomassie-Blue.

Fig. 21: Reverse Phase HPLC (RP-HPLC) des CHO-IFN- $\alpha$ 2c (a) und des E.coli-IFN- $\alpha$ 2c (b)

Fig. 22: Vergleichende Peptide Maps von Peak 1 (a) und Peak 2 (b) aus CHO-IFN- $\alpha$ 2c und von E.coli-IFN- $\alpha$ 2c (c)

Fig. 23: SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von CHO-IFN- $\alpha$ 2c und E.coli-IFN- $\alpha$ 2c. Spuren 1 und 8: Molekulargewichtsmarker (Skala in kD); Spuren 2-4: nichtreduzierende Bedingungen, Spuren 5-7: reduzierende Bedingungen;

Spuren 2 und 5: Peak 1 aus CHO-IFN- $\alpha$ 2c;

Spuren 3 und 6: Peak 2 aus CHO-IFN- $\alpha$ 2c;

Spuren 4 und 7: E.coli-IFN- $\alpha$ 2c;

Oberes Gel: Alle IFN-Spuren mit je 4  $\mu$ g;

Unteres Gel: Alle IFN-Spuren mit je 1  $\mu$ g;

Färbung: Coomassie Blue

Fig. 24: SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von CHO-IFN- $\alpha$ 2c und E.coli-IFN- $\alpha$ 2c vor und nach Inkubation mit 0,1 M NaOH.

Spuren 1 und 8: Molekulargewichtsmarker (Skala in kD); Spuren 2, 4, 6: unbehandelte Proben, Spuren 3, 5, 7: mit 0,1 M NaOH inkubierte Proben;

Spuren 2, 3: E.coli-IFN- $\alpha$ 2c,

Spur 4, 5: Peak 1 aus CHO-IFN- $\alpha$ 2c,

Spur 6, 7: Peak 2 aus CHO-IFN- $\alpha$ 2C;

Auf alle IFN-Spuren wurden je etwa 1,5  $\mu$ g unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen.

Färbung: Coomassie Blue

Beispiel 1

Konstruktion der Expressionsplasmide pAD-CMV13, pAD-CMV15 und pAD-CMV19

Aus Teilen von Expressionsplasmiden (pCDM8, Seed & Aruffo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 8573-8577; B. Seed, Nature 329 (1987) 840-842); Invitrogen, Inc., San Diego, CA; pSV2gptDHFR20, EP-A1 0321842) und -- dem Plasmid pBluescript KS- (Short et al., Nucleic Acids Res., 11 (1988) 5521-5540; Stratagene, La Jolla, CA)) wurden neue Plasmide konstruiert, die eine Multiklonierstelle für die gerichtete Insertion heterologer DNA-Sequenzen aufweisen und sich in E.coli mittels Ampicillinresistenz mit hoher Kopienzahl vermehren lassen. Die intergenische Region von M13 ermöglicht die Herstellung einzelsträngiger Plasmid-DNA nach Superinfektion der transformierten Bakterien mit einem Helferphagen (z.B. R408 oder M13K07), zur erleichterten Sequenziierung und Mutagenese der Plasmid-DNA. Der T7 Promotor, der der Multiklonierstelle vorangeht, ermöglicht in vitro die Herstellung von RNA Transkripten. In Säugetierzellen erfolgt die Expression heterologer Gene getrieben vom Cytomegalovirus (CMV) Promotor / Enhancer (M. Boshart et al., Cell 41 (1985) 521-530). Der SV40 Replikationsursprung ermöglicht in geeigneten Zelllinien (z.B. SV40 transformierte Zellen wie COS-7, Adenovirus transformierte Zelllinie 293 (ATCC CRL1573)) die

autonome Replikation des Expressionsplasmides zu hohen Kopienzahlen und damit hohe Raten in transienter Expression. Für die Herstellung permanent transformierter Zelllinien und die nachfolgende Amplifikation der Expressionskassette mittels Methotrexat dient ein modifiziertes Hamster Minigen (Promotor mit kodierendem Bereich und dem ersten Intron) für Dihydrofolatreduktase (DHFR) als Selektionsmarker.

Herstellung der Vektor- und Promotoranteile durch Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Das Plasmid pBluescript KS- wurde mit HindIII linearisiert und 100 ng DNA in einem 100 µl PCR (Saiki et al., Science 239 (1988) 487-491) Ansatz eingesetzt (Reaktionsmedium: 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl pH 8,3, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% (w/v) Gelatine, 0,2 mM jeder der vier Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2,5 units Taq Polymerase pro 100 µl). Als Primer wurden je 50 pmol der synthetischen Oligonukleotide EBI-1786 (5'-GGAATTTCAGCCTGAA- TGGCGAATGGG-3') und EBI-2134 (5'-CACTGAACTCGAGCAGC-TGCCTTGCTGGCGTTTTCC-3') eingesetzt. Nach 5 Minuten Denaturieren bei 94°C erfolgte die PCR über 10 Zyklen (Zyklusbedingungen: 40 sec bei 94°C, 45 sec bei 55°C, 5 Min bei 72°C, Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler). Die Oligonukleotide flankieren die intergenische Region von M13 bzw. den Replikationsursprung (ori) mit dem dazwischenliegenden Gen für die B-Lactamase. Gleichzeitig wird am Ende des ori eine XhoI- und eine PvuII- und am anderen Ende eine EcoRI-Schnittstelle erzeugt. Das Reaktionsgemisch wurde durch Extraktion mit Phenol-Chloroform von Protein befreit und die DNA

mit Äthanol präzipitiert. Die erhaltene DNA wurde mit XbaI und EcoRI geschnitten und nach Elektrophorese in einem Agarosegel ein Fragment mit 2,3 kb isoliert. 50 ng mit SacII linearisiertes Plasmid pCDM8 wurde mit den Oligonukleotiden EBI-2133 (5'-GGTCACTGTCGACAT-TGATTATTGACTAG-3') und EBI-1734 (5'-GGAATTCCCT-AGGAATACAGCGG-3') unter identischen Bedingungen wie zuvor beschrieben durch PCR amplifiziert. Die Oligonukleotide binden am Beginn der CMV-Promotor / Enhancer Sequenz und erzeugen eine SalI Schnittstelle (EBI-2133), bzw. binden am Ende der SV40 poly-Adenylierungstelle und erzeugen eine EcoRI Schnittstelle (EBI-1734). Das PCR Produkt wurde mit SalI und EcoRI geschnitten und ein DNA Fragment von 1,8 kb aus einem Agarosegel isoliert.

Die beiden nachgeschnittenen PCR Produkte wurden mit T4 DNA-Ligase ligiert und E.coli HB101 transformiert. Ein Plasmid der gewünschten Struktur (siehe Fig.1) wurde pCMV+M13 benannt.

Der SV40 Replikationsursprung (SV40 ori) wurde aus dem Plasmid pSV2gptDHFR20 (EP-A1 0321842) isoliert. Dazu wurde dieses Plasmid mit HindIII und PvuII doppelt geschnitten und die DNA-Enden durch nachfolgende Behandlung mit dem großen Fragment der E.coli DNA Polymerase (Klenow Enzym) in Gegenwart der vier Desoxynukleotidtriphosphate stumpf gemacht. Ein entstandenes 0,36 kb DNA Fragment wurde aus einem Agarosegel isoliert und in mit EcoRI linearisiertem Plasmidvektor pCMV+M13 ligiert. Ein nach Transformation von E.coli HB101 erhaltenes Plasmid, das den SV40 ori in gleicher Orientierung wie B-Lactamase Gen und CMV-Promotor enthielt, wurde pCMV+SV40 benannt (Fig.1).

Plasmid pCMV+SV40 wurde mit EcoRI und BamHI doppelt geschnitten und die DNA-Enden anschließend mit Klenow-Enzym stumpf gemacht. Die DNA wurde durch Extraktion mit Phenol-Chloroform und Äthanolfällung gereinigt. Ein Teil der DNA wurde mit T4 DNA Ligase zirkularisiert und ein nach Transformation von E.coli erhaltenes Plasmid pAD-CMV10 benannt (Fig.2). Der Rest der pCMV+SV40 DNA wurde durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und der 4,4 kb lange Vektor aus einem Agarosegel isoliert.

Plasmid pSV2gptDHFR-Mut2 (siehe Beispiel 4, Fig. 9), das ein modifiziertes Hamster Dihydrofolatreduktase (DHFR) Minigen enthält, aus dem durch gerichtete Mutagenese die Restriktionsenzymeschnittstellen für EcoRI, PstI, BglII, BamHI und KpnI entfernt wurden, wurde mit EcoRI und PstI doppelt geschnitten und die DNA-Enden durch 20 Minuten Inkubation bei 11°C mit 5 units T4 DNA-Polymerase (Reaktionsmedium: 50 mM Tris-Cl pH 8,0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Dithiothreit, 0,1 mM jedes der vier Desoxynukleotidtriphosphate, 50 µg/ml Rinderserumalbumin) stumpf gemacht. Das 2,4 kb lange DNA-Fragment mit dem mutierten DHFR-Gen wurde aus einem Agarosegel isoliert und mit dem wie oben beschriebenen präparierten pCMV+SV40 ligiert. Ein nach Transformation von E.coli erhaltenes Plasmid, in dem das DHFR-Gen in derselben Orientierung wie der CMV-Promotor enthalten war, wurde pAD-CMV10A benannt (Fig.2).

Ausgehend vom Expressionsplasmid pAD-CMV1 (siehe Beispiel 4, Fig. 10), das zwischen Multiklonierstelle und poly-Adenylierungssignal eine Intronsequenz enthält, wurden mehrere Varianten hergestellt, die sich durch die Anzahl und Lage der Introns relativ zur Multiklonierstelle unterscheiden. In pAD-CMV13 (Fig. 4)

wurde das SV40 t Antigen Intron zwischen Multiklonierstelle und poly-Adenylierungstelle deletiert; pAD-CMV15 (Fig. 3) enthält ein synthetisches Intron zwischen CMV Promotor und Multiklonierstelle und das SV40 t Antigen Intron zwischen Multiklonierstelle und poly-Adenylierungssignal; pAD-CMV19 (Fig. 4) enthält nur ein Intron zwischen CMV Promotor und Multiklonierstelle.

Ausgehend von 100 ng des mit HindIII linearisierten Plasmid pAD-CMV1 wurde mit je 50 pMol der Oligonukleotide EBI-2625 (5'-CACTGATCTAGAGATATCTGTTATTGCAGCTATAATGG-3') und EBI-1857 (5'-GGCAAGGGCAGCAGCCGG-3') in 100 µl PCR Ansatz (siehe oben) in 10 PCR Zyklen (40 sec 94°C, 45 sec 55°C, 90 sec 72°C) ein 1,26 kb langes DNA Fragment amplifiziert. EBI-2625 bindet kurz vor dem SV40 poly-Adenylierungssignal (Position 1280 in pAD-CMV1) und enthält zusätzliche Restriktionsschnittstellen für XbaI und EcoRV. EBI-1857 bindet am komplementären DNA Strang im ersten Intron des nachfolgenden DHFR Minigens (Position 2525 in pAD-CMV1). Das PCR Produkt wurde durch Extraktion mit Phenol und Chloroform von Protein befreit und die DNA mit Äthanol gefällt. Die DNA wurde mit XbaI und BglII doppelt geschnitten, ein 0,32 kb langes DNA Fragment aus einem Agarosegel isoliert und in mit den gleichen Enzymen doppelt geschnittenen Plasmidvektor (5,8 kb) pAD-CMV1 ligiert. Ein nach Transformation von E.coli HB101 erhaltenes Plasmid der gewünschten Beschaffenheit (siehe Fig.4) wurde pAD-CMV13 benannt.

Die dem CMV Promotor folgende Spleiß-Donor Sequenz (M. Boshart et al., Cell 41 (1985) 521-530) wurde durch SOE-PCR (splicing by overlap extension; S.N. Ho et al., Gene 77 (1989) 51-59) mit der Spleiß-Acceptorstelle

des ersten Introns des humanen  $\beta$ -Globin Gens (Lawn et al., Cell 21 (1980) 647-651) gefolgt von der Multiklonierstelle von Plasmid pAD-CMVL verbunden. Dazu wurden 100 ng Plasmid pGJ7 (G. Jahn et al., J. Virology 49 (1984) 363-370) enthaltend die Promotor und Enhancer Sequenz von humanem Cytomegalovirus StammAD169 (Boshart et al., Cell 41 (1985) 521-530) mit je 50 pMol der Oligonukleotide EBI-2133 (siehe oben) und EBI-2586 (5'-GCAGAGAGTCAGTGCCTATCAGAAACCAAGAG-TCTTCTCTATAGGCGGTACTTACCTGACTCTG-3') in 100  $\mu$ l PCR Reaktionsgemisch über 30 Zyklen amplifiziert (Zyklusbedingungen: 40 sec 94°C, 45 sec 45°C, 90 sec 72°C). Die letzten 24 Basen von EBI-2586 passen perfekt an die CMV-Sequenz (in antisense Orientierung) und die vorangehenden Basen entsprechen der  $\beta$ -Globin Intron Sequenz, wobei 18 Basen perfekt zur revers komplementären Sequenz von Oligonukleotid EBI-2585 passen und die überlappende DNA-Sequenz für die SOE-PCR bilden. Die PCR Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und ein 0,8 kb DNA Fragment isoliert (Fig.3). 100 ng Plasmid pAD-CMVL wurden in gleicher Weise mit den Oligonukleotiden EBI-2585 (5'-GCACTGACTCTCTGCCTATTGGTCTATTCCCACCCCTAGGCTGCT-GGTGCTTAAGGCTTATCG-3') und EBI-2112 (5'-GTCCAATTATGTCACACC-3') durch PCR amplifiziert und ein 0,2 kb DNA Fragment aus einem Agarosegel isoliert. EBI-2585 enthält die letzten 45 Basen des  $\beta$ -Globin Introns und die fünf darauf folgenden Basen, sowie 17 Basen am 3'-Ende, die perfekt an Position 611-627 der pAD-CMVL Sequenz hybridisieren können. EBI-2112 bindet am komplementären DNA Strang an Position 743-760 an die pAD-CMVL Sequenz. 1/10 des isolierten 0,8 kb DNA Fragments und 1/30 des 0,2 kb DNA Fragments wurden in einem neuen 100  $\mu$ l PCR Ansatz (SOE-PCR) gemischt und mit je 50 pMol der Oligonukleotide EBI-2133 und EBI-2112 in 30 PCR Zyklen (40 sec 94°C, 45 sec 45°C, 2

Min 72°C) amplifiziert. Die Reaktion wurde durch Extraktion mit Phenol und Chloroform gestoppt und die DNA mit Äthanol gefällt. Die 5'-Enden des PCR Produktes wurden mit T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert (Reaktionspuffer: 70 mM Tris-Cl pH 7,6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Dithiothreit, 1 mM ATP) und anschließend mit XbaI geschnitten. Die DNA wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und ein Fragment von 0,98 kb Länge isoliert. Plasmid pAD-CMV10 wurde mit PvuII und XbaI doppelt geschnitten und der Vektoranteil ohne CMV Promotor aus einem Agarosegel isoliert. Dieser Plasmidvektor wurde mit dem 0,97 kb DNA Fragment, enthaltend den CMV Promotor und Enhancer mit Intron und Multiklonierstelle, ligiert und E.coli HB101 transformiert. Von den erhaltenen Transformanten wurde Plasmid DNA hergestellt und das neue DNA Insert mit den Oligonukleotiden EBI-2112, EBI-2586 und EBI-1733 (5'-GGTCGACATTGATTATTGACTAG-3') nach der Didesoxy-Kettenabbruch Methode (F. Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463-5467) mit modifizierter T7 DNA Polymerase (S. Tabor and C.C. Richardson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (4767-4771); Sequenase, United States Biochemical Corp.) sequenziert. Ein Plasmid mit der erwarteten Sequenz wurde pAD-CMV15 benannt (Fig.3).

pAD-CMV10A wurde mit SpeI und BglII doppelt geschnitten und der Vektoranteil ohne CMV Promotor aus einem Agarosegel isoliert. pAD-CMV15 wurde mit SpeI und HindIII doppelt geschnitten und ein 0,8 kb DNA Fragment enthaltend den CMV Promotor und das synthetische Intron, isoliert. pAD-CMV13 wurde mit HindIII und BglII doppelt geschnitten und ein 0,36 kb DNA Fragment isoliert, das die Multiklonierstelle, das SV40 early poly-Adenylierungssignal und einen Teil der Hamster-DHFR Promotorregion enthielt. Diese drei DNA Fragmente

wurden mit T4 DNA Ligase ligiert und E.coli HB101 transformiert. Von den erhaltenen Transformanten wurde Plasmid DNA hergestellt und durch Schneiden mit verschiedenen Restriktionsenzymen charakterisiert. Ein Plasmid der gewünschten Struktur wurde pAD-CMV19 benannt (Fig.4, Fig.5).

#### Beispiel 2

##### Herstellung einer modifizierten cDNA für huIFN- $\alpha$ 2c

Die für humanes IFN- $\alpha$ 2c kodierende cDNA des Klons 1F7 (E. Dworkin-Rastl et al., J.Interferon Res. 2 (1982) 575-585; E. Dworkin-Rastl et al., Gene 21 (1983) 237-248) wurde mittels PCR in der 5'-nicht kodierenden Region modifiziert, indem diese gegen die Sequenz der 5'-nicht-kodierenden Region der humanen  $\beta$ -Globin mRNA (Lawn et al., Cell 21 (1980) 647-651) ausgetauscht wurde. Eine derartige Veränderung der 5'-nicht-kodierenden Region bewirkt eine deutliche Erhöhung der Expression, möglicherweise durch eine effizientere Initiation der Translation. Gleichzeitig wurden an beiden Enden der cDNA Restriktionsenzymeschnittstellen eingeführt, die eine nachfolgende gerichtete Klonierung der cDNA in Expressionsplasmide erleichterten.

100 ng mit EcoRI linearisiertes Plasmid 1F7 wurden mit je 50 pMol der Oligonukleotide EBI-2747 (5'-CTTCAGAAGCTTACATTCGCTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGCAACCT-CAAACAGACACCATGGCCTTGACCTTGCTTAC-3') und EBI-2744 (5'-GACTTCAGTCTAGAGAACCGAGTTTCATTCCTTACTTC-3') in 100  $\mu$ l PCR Ansatz in 20 Zyklen (40 sec 94°C, 45 sec 55°C, 90 sec 72°C) amplifiziert. EBI-2747 enthält nach einer HindIII Schnittstelle die 5'-nicht-kodierende Region der humanen  $\beta$ -Globin mRNA gefolgt von den ersten 22 Basen der für das Signalpeptid von huIFN- $\alpha$ 2c

kodierenden Sequenz (Startkodon ist unterstrichen). EBI-2744 bindet am komplementären Strang am Ende der für huIFN- $\alpha$ 2c kodierenden Sequenz (Stopkodon ist unterstrichen) und enthält eine Schnittstelle für XbaI. Die Reaktion wurde durch Extraktion mit Phenol und Chloroform gestoppt und die DNA mit Äthanol gefällt. Das PCR Produkt wurde mit HindIII und XbaI an den Enden nachgeschnitten und das 0,64 kb lange DNA Fragment aus einem Agarosegel isoliert (Fig.6, Fig.7). Plasmid pAD-CMV19 wurde ebenfalls mit HindIII und XbaI doppelt geschnitten und anschließend mit dem cDNA Fragment ligiert. Nach Transformation von E.coli HB101 erhaltene Kolonien wurden zur Präparation von Plasmid DNA gezüchtet. Eines der erhaltenen Plasmide wurde über den Verlauf des insertierten HindIII-XbaI Bereiches vollständig sequenziert. Mit Ausnahme eines einzigen Basenaustausches (CTG zu TTG) im 8. Kodon des Signalpeptides, der jedoch zu keiner Änderung der kodierten Aminosäure (Leu) führte, wurde die erwartete Sequenz erhalten. Das Expressionsplasmid für sekretiertes und O-glycosyliertes huIFN- $\alpha$ 2c wurde pAD19B-IFN benannt (Fig.6).

#### Beschreibung der Sequenzelemente von Plasmid pAD-CMV19 (Fig.5)

##### Basen

- 1 - 21 Bindungsstelle von Oligonukleotid EBI-2133
- 1 - 590 Cytomegalovirus Enhancer und Promotor
- 722 - 740 Intronsequenz von Cytomegalovirus (Splice Donor)
- 741 - 805 Intronsequenz von humanem  $\beta$ -Globin (Splice Acceptor)
- 836 - 853 T7 Promotor
- 862 - 922 Multiklonierstelle

923 -1055 Polyadenylierungsstellen von SV40  
1056 -1953 Promotor und 5'-nicht kodierende Region  
von Hamster DHFR Gen  
1954 -2039 DHFR Exon 1  
2040 -2333 DHFR Intron 1  
2151 -2168 Bindungstelle von EBI-1857  
2344 -2821 DHFR Exons 2-6 kodierender Bereich  
2822 -3474 DHFR 3'-nicht kodierende Region  
3475 -3812 SV40 Replikationsursprung (SV40 ori)  
3813 -6055 pBluescript Anteil  
3813 -4291 M13 intergenische Region (M13 ori)  
4423 -5283 B-Lactamase, kodierende Region  
6038 -6062 Bindungstelle von EBI-2134

### Beispiel 3

Transiente Expression von huIFN- $\alpha$ 2c in höheren  
eukaryotischen Zellen

Etwa  $10^6$  Zellen (293, humane embryonale Nierenzellen  
transformiert mit einem Teil des Adenovirus AD5 Genoms;  
F.L. Graham et al., J.Gen.Virol., 36 (1977) 59-77;  
ATCC CRL1573) pro 80 mm Petrischale wurden 24 Stunden  
vor der Transfektion mit Medium (Dulbecco's  
MEM/Nutrient Mix F12 (1:1) mit 15 mM Hepes; Gibco) mit  
10% hitzeaktiviertem fötalem Kälberserum angesetzt  
und bei 37°C in 5%  $CO_2$  Atmosphäre inkubiert. Die  
Zellen wurden 3 Stunden vor der Transfektion mit 10 ml  
frischem Medium versehen und bei 37°C inkubiert. 10  $\mu$ g  
Plasmid DNA (gereinigt durch zweimalige CsCl  
Dichtegradientenzentrifugation) pAD19B-IFN gelöst in  
0,5 ml 250 mM  $CaCl_2$  wurden tropfenweise zu 0,5 ml 2x  
HBS (16,36 g/l NaCl, 11,9 g/l Hepes, 0,40 g/l  
 $Na_2HPO_4$ , pH 7,12) zugefügt. Das entstandene  
Präzipitat wurde zu einer Petrischale zugegeben und die  
Zellen weitere 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen

wurden mit PBS gewaschen, 30 Sekunden mit 15% Glyzerin in 1x HBS geschockt, nochmals mit PBS gewaschen und mit 10 ml frischem Medium mit 10% Kälberserum bei 37°C inkubiert. Nach 72 Stunden wurde der Zellüberstand geerntet und zum Nachweis des sekretierten IFN verwendet.

Beispiel 4:

Konstruktion der Expressionsplasmide pAD-CMV1 und pAD-CMV2

Aus Teilen der Expressionsplasmide pCDM8 (Seed & Aruffo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 8573-8577; Seed, Nature 329 (1987) 840-842; Invitrogen Inc., San Diego, CA); pSV2gptDHFR20 (EP-A1 0321 842) und dem Plasmid Bluescript SK+ (Short et al., Nucleic Acids Res., 11 5521-5540; Strategene, La Jolla, CA) wurde ein neues Plasmid konstruiert, das eine Multiklonierstelle für die gerichtete Insertion heterologer DNA-Sequenzen aufweist und sich in E.coli mittels Ampicillinresistenz mit hoher Kopienzahl vermehren lässt. Die intergenische Region von M13 ermöglicht die Herstellung einzelsträngiger Plasmid-DNA mittels Superinfektion der transformierten Bakterien mit einem Helferphagen (z.B. R408 oder M13K07) zur erleichterten Sequenzierung und Mutagenese der Plasmid-DNA. Der T7 Promotor, der der Multiklonierstelle vorangeht, ermöglicht die Herstellung von RNA Transkripten in vitro. In Säugetierzellen erfolgt die Expression heterologer Gene getrieben vom Cytomegalovirus (CMV) Promotor/Enhancer (Boshart et al., Cell 41 (1985) 521-530). Der SV40 Replikationsurprung ermöglicht in geeigneten Zelllinien (z.B. SV 40 transformierte Zellen wie COS-7, Adenovirus transformierte Zelllinie 293 (ATCC CRL1573)) die autonome Replikation des Expressionsplasmides zu hohen

Kopienzahlen und damit hohe Raten in transienter Expression. Für die Herstellung permanent transformierter Zelllinien und die nachfolgende Amplifikation der Expressionskassette mittels Methotrexat dient ein modifiziertes Hamster-Minigen (Promotor mit kodierendem Bereich und dem ersten Intron) für Dihydrofolatreduktase (DHFR) als Selektionsmarker.

a) Herstellung der Vektor- und Promotoranteile durch PCR

Das Plasmid Bluescript SK+ wurde mit HindIII linearisiert und 5 ng DNA in einem 100 µl PCR Ansatz eingesetzt (Reaktionspuffer: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH=8,3, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% (w/v) Gelatine, 0,2 mM der vier Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2,5 Einheiten Tag Polymerase pro 100 µl). Als Primer wurden je 50 pmol der synthetischen Oligonukleotide EBI-1786 (5'-GGAATTCAAGCCTGAA-TGGCGAATGGG-3'; bindet knapp außerhalb von M13 ori-Region in Bluescript Pos. 475, unabhängig von M13 ori-Orientierung) und EBI-1729 (5'-CCTCGAGCGTTGC-TGGCGTTTCC-3'; bindet an Bluescript an Pos. 1195 vor ori, entspricht dem Anfang der Bluescript-Sequenz in pCDM8, 6 Basen 5' ergeben XhoI) eingesetzt. Nach 5 Minuten Denaturieren bei 94°C erfolgte die PCR über 20 Zyklen (40 sec bei 94°C, 45 sec bei 55°C, 5 Min bei 72°C, Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler). Die Oligonukleotide flankieren die intergenische Region von M13 bzw. den Replikationsursprung (ori) mit dem dazwischenliegenden Gen für die B-Lactamase. Gleichzeitig wird am Ende des Replikationsursprungs eine XhoI- und am anderen Ende eine EcoRI-Schnittstelle erzeugt. Das Reaktionsgemisch wurde durch Extraktion mit Phenol-Chloroform von Protein befreit und die DNA

mit Ethanol präzipitiert. Die erhaltene DNA wurde mit XbaI und EcoRI geschnitten und nach Elektrophorese in einem Agarosegel ein Fragment mit 2,3 kb isoliert.

5 ng mit SacII linearisiertes Plasmid pCDM8 wurden mit den Oligonukleotiden EBI-1733 (5'-GGTCGACATTGA-  
TTATTGACTAG-3'; bindet an CMV-Promotorregion (Pos.  
1542) von pCDM8, entspricht Pos.1 in pAD-CMV,  
SalI-Stelle für Klonierung) und  
EBI-1734(5'-GGAATTCCCTAGGAATACAGCGG-3'; bindet an  
Polyoma origin von 3' SV40 polyA-Region in pCDM8 (Pos.  
3590)) unter identischen Bedingungen wie für Bluescript  
SK+ beschrieben, durch PCR amplifiziert. Die  
Oligonukleotide binden am Beginn der  
CMV-Promotor/Enhancer-Sequenz und erzeugen eine SalI  
Schnittstelle (EBI-1733) bzw. binden am Ende der SV40  
poly-Adehylierungstelle und erzeugen eine EcoRI  
Schnittstelle (EBI-1734). Das PCR-Produkt wurde mit  
SalI und EcoRI geschnitten und ein DNA Fragment von 1,8  
kb aus einem Agarosegel isoliert.

Die beiden PCR Produkte wurden mit T4 DNA-Ligase  
ligiert, mit dem erhaltenen Ligationsprodukt E.coli  
HB101 transformiert und nach Standardmethoden  
Plasmid-DNA amplifiziert und präpariert. Das Plasmid  
der gewünschten Beschaffenheit (siehe Fig.8) wurde  
pCMV-M13 benannt.

Der SV40 Replikationsursprung (SV40 ori) wurde aus dem  
Plasmid pSV2gptDHFR20 (EP-A1 0321842) isoliert. Dazu  
wurde dieses Plasmid mit HindIII und PvuII doppelt  
geschnitten und die DNA-Enden durch nachfolgende  
Behandlung mit dem großen Fragment der E.coli DNA  
Polymerase (Klenow Enzym) in Gegenwart der vier  
Desoxynukleotidtriphosphate stumpf gemacht. Ein dabei  
erhaltenes 0,36 kb DNA Fragment wurde aus einem

Agarosegel isoliert und in mit EcoRI linearisiertem pCMV-M13 ligiert. Ein nach Transformation von E.coli HB101 erhaltenes Plasmid mit dem SV40 ori in gleicher Orientierung wie das  $\beta$ -Lactamase Gen und dem CMV-Promotor wurde pCMV-SV40 benannt. Die Konstruktion dieses Plasmids ist in Fig.8 dargestellt.

b) Mutagenese des DHFR-Gens

Zur Herstellung eines Expressionsplasmids mit einer vielseitigen Multiklonierstelle wurden aus dem DHFR Minigen durch gerichtete Mutagenese zwei und durch Deletion drei Restriktionsenzymeschnittstellen entfernt. Dazu wurde aus dem Plasmid pSV2gptDHFR20 ein 1,7 kb BglII Fragment, das die gesamte kodierende Region des Hamster DHFR-Gens enthält, in die BglII Stelle des Plasmids pUC219 (IBI) kloniert und das Plasmid pUCDHFR erhalten. Mit pUCDHFR transformierte E.coli JM109 (Stratagene) Zellen wurden mit etwa 40-fachem Überschuß des Helferphagen R408 (Stratagene) infiziert und 16 Stunden bei 37°C in LB-Medium geschüttelt. Aus dem Bakterienüberstand wurde einzelsträngige Plasmid-DNA isoliert.

Die gerichtete Mutagenese erfolgte in zwei aufeinanderfolgenden Schritten, wobei das in vitro Mutagenese System RPN1523 (Amersham) verwendet wurde. Die am Beginn von Exon 2 befindliche EcoRI Stelle wurde durch Austausch einer Base von GAATTC zu GAGTTC zerstört. Dieser Basenaustausch führt zu keiner Änderung der kodierten Aminosäuresequenz und entspricht außerdem der Nukleotidsequenz im natürlichen murinen DHFR-Gen (McGrogan et al., J. Biol. Chem. 260 (1985) 2307-2314; Mitchell et al., Mol. Cell. Biol. 6 (1986) 425-440). Für die Mutagenese wurde ein Oligonukleotid (Antisense-Orientierung) der Sequenz 5'-GTACTTGA-

ACTCGTTCCCTG-3' (EBI-1751) verwendet. Ein Plasmid mit der gewünschten Mutation wurde, wie oben beschrieben, als Einzelstrang-DNA präpariert und die im ersten Intron befindliche PstI Stelle durch Mutagenese mit dem Oligonukleotid EBI-1857 (Antisense Orientierung, 5'-GGCAAGGGCAGCAGCCGG-3') von CTGCAG in CTGCTG entfernt. Die Mutationen wurden durch Sequenzierung bestätigt und das erhaltende Plasmid pUCDHFR-Mut2 benannt. Aus dem Plasmid pUCDHFR-Mut2 wurde das 1,7 kb BglIII Fragment isoliert und in mit BglIII und BamHI doppelt geschnittenes Plasmid pSV2gptDHFR20 ligiert. Nach Transformation von E.coli, Amplifikation und DNA-Isolierung wurde ein Plasmid der gewünschten Beschaffenheit erhalten, das als pSV2gptDHFR-Mut2 bezeichnet wurde. Durch Schneiden mit BamHI wurde in der 3'-nicht-kodierenden Region des DHFR Gens ein auf die BglIII Stelle folgendes 0,12 kb DNA-Fragment entfernt, das außerdem noch eine KpnI Schnittstelle enthält. Durch Verknüpfen der mit BglIII und BamHI entstandenen überhängenden DNA-Enden wurden auch die Erkennungssequenzen für diese beiden Enzyme zerstört.

Das Plasmid pCMV-SV40 wurde mit EcoRI und BamHI doppelt geschnitten, die DNA-Enden nachfolgend mit Klenow-Enzym stumpf gemacht. Die DNA wurde durch Extraktion mit Phenol-Chloroform und Ethanolfällung gereinigt, anschließend durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und die 4,4 kb lange Vektor DNA aus einem Agarosegel isoliert.

Das Plasmid pSV2gptDHFR-Mut2 (Fig.9) wurde mit EcoRI und PstI doppelt geschnitten und die DNA-Enden durch 20 Minuten Inkubation bei 11°C mit 5 Einheiten T4 DNA-Polymerase (50 mM Tris-HCl pH=8,0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Dithiothreit, 0,1 mM jedes der vier Desoxynukleotidtriphosphate, 50 µg/ml

Rinderserumalbumin) stumpf gemacht. Das 2,4 kb lange DNA-Fragment mit dem mutierten DHFR-Gen wurde aus einem Agarosegel isoliert und mit dem wie oben beschrieben präparierten pCMV-SV40 ligiert. Ein nach Transformation von E.coli erhaltenes Plasmid, das das DHFR-Gen in derselben Orientierung wie den CMV-Promotor enthielt, wurde pCMV-SV40DHFR benannt. Im letzten Schritt wurde das 0,4 kb "Stuffer"-Fragment nach dem CMV-Promotor, das noch aus dem Ausgangsplasmid pCDM8 stammte, gegen eine Multiklonierstelle ausgetauscht. Dazu wurde das Plasmid pCMV-SV40DHFR mit HindIII und XbaI doppelt geschnitten und der Vektoranteil aus einem Agarosegel isoliert. Die Multiklonierstelle, gebildet aus den beiden Oligonukleotiden EBI-1823 (5'-AGCTTCTGCAGGTCGA-CATCGATGGATCCGGTACCTCGAGCGGCCGCGAATTCT-3') und EBI-1829 (5'-CTAGAGAATTCGCGGCCGCTCGAGGTACCGGATCCATCGATG-TCGACCTGCAGA-3'), enthält inklusive der für die Klonierung in HindIII - XbaI kompatiblen Enden Restriktionsschnittstellen für die Enzyme PstI, SalI, ClaI, BamHI, KpnI, XhoI, NotI und EcoRI.

Je 1 µg der beiden Oligonukleotide wurden in 20 µl Reaktionspuffer (70 mM Tris-Cl pH=7,6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Dithiothreit, 0,1 mM ATP) mit 5 Einheiten T4 Polynukleotidkinase eine Stunde bei 37°C inkubiert, um die 5'-Enden zu phosphorylieren. Die Reaktion wurde durch 10 minütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt und die komplementären Oligonukleotide miteinander hybridisiert, indem die Probe weitere 10 Minuten bei 56°C inkubiert und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt wurde. 4 µl der hybridisierten Oligonukleotide (100 ng) wurden mit etwa 100 ng Plasmidvektor ligiert und E.coli HB101 transformiert. Ein Plasmid, das sich mit den Enzymen der Multiklonierstelle (ausgenommen NotI) linearisieren ließ, wurde pAD-CMV1 benannt. Von vielen getesteten

Klonen konnte keiner identifiziert werden, dessen Plasmid sich mit NotI schneiden ließ. Die Sequenzierung zeigte immer die Deletion von einigen Basen innerhalb der NotI Erkennungssequenz. In gleicher Weise wurde mit dem Oligonukleotidpaar EBI-1820 (5'-AGCTCTAGAGAATT-CGCAGCCGCTCGAGGTACCGGATCCATCGATGTCGACCTGCAGAAGCTTG-3') und EBI-1821 (5'-CTAGCAAGCTTCTGCAGGTCGACATCGATGGATCCGGTACCTCGAGCGGCCGGAATTCTCTAG-3') das Expressionsplasmid pAD-CMV2 hergestellt, das die Restriktionsschnittstellen innerhalb der Multiklonierstelle in umgekehrter Reihenfolge enthält. Dabei wurde das Plasmid pAD-CMV2 erhalten, das sich mit sämtlichen Restriktionsenzymen, einschließlich NotI, linearisieren ließ.

Die Nukleotidsequenz des 6414 bp großen Plasmids pAD-CMV1 (Fig.10) ist in Fig.11 vollständig dargestellt.

Die Abschnitte auf dem Plasmid (angegeben in der Numerierung der Basen) entsprechen folgenden Sequenzen:

1-21	EBI-1733, Beginn CMV Enhancer - Promotor (aus CDM8)
632-649	T7 Promotor
658-713	Multiklonierstelle (HindIII bis XbaI aus EBI-1823, EBI-1829)
714-1412	SV40 Intron und poly-Adenylierungsstelle (aus CDM8)
1413-2310	5' nicht kodierende Region und Promotor des Hamster DHFR Gens (aus pSV2gptDHFR20)
2311-2396	Hamster DHFR: Exon 1
2516	A zu T Mutation zerstört PstI Stelle in DHFR Intron 1
2701-3178	DHFR Exons 2-6 (kodierende Region)
2707	A zu G Mutation zerstört EcoRI Stelle

3272-3273      Deletion zwischen BglII und BamHI in DHFR  
3' nicht kodierender Region  
3831      Ende DHFR Gen (aus pSV2gptDHFR20)  
3832-4169      SV40 ori (aus pSV2gptDHFR20)  
4170-4648      M13 ori (aus pBluescript SK+)  
4780-5640       $\beta$ -Lactamase (kodierende Region)  
6395-6414      EBI-1729, Ende der pBluescript  
Vektorsequenz

Die Herstellung der Plasmide pAD-CMV1 und pAD-CMV2 ist in Fig.10 dargestellt.

#### Beispiel 5

Entwicklung von rekombinanten "Chinese hamster ovary (CHO)"-Zelllinien, die glycosyliertes Human-Interferon- $\alpha$ 2 produzieren

##### a) Transfektion von CHO-Zellen und Selektion stabil transfizierter Zelllinien

Die parentalen Zelllinien, CHO-DXB11 und CHO-DG44 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220, 1980; Som. Cell. Molec. Genet. 12, 555-666, 1986) wurden in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium 1640 supplementiert mit 10% fötalem Rinderserum, Hypoxanthin (100  $\mu$ M), Thymidin (16  $\mu$ M), Natrium-Penicillin G (100 Einheiten/ml), und Streptomycin (50 Einheiten/ml) gezüchtet. Zwei Tage vor der Transfektion wurden die Zellen in 25  $\text{cm}^2$  - Flaschen angesetzt; zum Zeitpunkt der Transfektion waren die Zellen nahezu konfluent.

Das Transfektionsexperiment wurde wie folgt durchgeführt. 20  $\mu$ l einer Lösung von Plasmid pAD19B-IFN (1 $\mu$ g/ml) wurden mit 125  $\mu$ l 2 M  $\text{CaCl}_2$  und 855  $\mu$ l sterilem deionisiertem Wasser verdünnt. Diese Lösung wurde tropfenweise zu 1 ml 2 x HSB

zugesetzt (1 x HSB enthält pro Liter Lösung: 8,18 g NaCl, 5,94 g HEPES, 0,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,1). Das Kulturmedium der CHO-Zellen wurde entfernt, und 0,25 ml der Suspension wurden zu jeder Flasche zugesetzt; die Kulturen wurden 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde dann entfernt, die Zellen wurden mit Hilfe von Trypsin/EDTA-Lösung von der Oberfläche gelöst und in Selektionsmedium suspendiert (das Selektionsmedium bestand aus Minimum Essential Medium, alpha-Modifikation ohne Ribonucleotide and Deoxyribonucleotide, ergänzt mit 10% dialysiertem fötalem Rinderserum, Natrium-Penicillin G 100 Einheiten/ml, Streptomycin 50 Einheiten/ml, and Amphotericin B 2,5 µg/ml; 40 ml pro Flasche). Die Zellsuspension wurde dann in die Vertiefungen von zwei Zellkultur-Mikrotiterplatten transferiert (96 Vertiefungen pro Platte, 0,2 ml pro Vertiefung) und zwei Wochen bei 37°C inkubiert. Das angegebene Selektionsmedium wurde, allerdings ohne Amphotericin B, auch für alle weiteren Experimente verwendet.

Die Zellkulturen wurden visuell auf Zellwachstum überprüft. Kulturmedium aus Vertiefungen, die Zellwachstum zeigten, wurden auf IFN-α2-Gehalt mit Hilfe eines Enzym-Immunoassays getestet, der zwei monoklonale Antikörper gegen IFN-α2 verwendet (Biochem. J. 276, 511-518, 1991). Dieser Test wurde mit neuen Kulturüberständen eine Woche später wiederholt. Zellen aus positiven Kulturen wurden mit Hilfe von Trypsin/EDTA-Lösung von der Oberfläche gelöst und jeweils in Kulturplatten mit 24 Vertiefungen transferiert. Kulturen, die gutes Zellwachstum zeigten, wurden dann wiederholt auf IFN-Produktion getestet. Die IFN-α2 - Konzentrationen in den Überständen lagen typischerweise im Bereich zwischen 2.000 und >10.000 Einheiten/ml (1 ng IFN-α2 - Protein entspricht 230 Einheiten).

b) Amplifikation des IFN- $\alpha$ 2 Gens durch  
Methotrexat-Selektion

Transfizierte Klone von beiden Parental-Zelllinien, CHO-DXB11 und CHO-DG44, die in mehreren Tests hohe IFN-Konzentrationen gezeigt hatten, wurden für die Amplifikation ausgewählt; zusätzlich wurden jeweils 3 - 5 weitere Klone vereinigt. Diese Kulturen wurden nun in 25 cm<sup>2</sup> - Flaschen in Selektionsmedium (ohne Amphotericin B) gehalten, dem Methotrexat in Konzentrationen von 20 nM oder 50 nM zugesetzt wurde. Die Kulturen wurden wöchentlich einmal mit frischem Medium versehen. Überlebende Klone wurden nach etwa 2 - 3 Wochen beobachtet. Sobald die Zellen etwa 50% der Kulturfäche bewachsen hatten, wurden die Überstände wieder auf ihren IFN- $\alpha$ 2 Gehalt getestet. Die Zellen wurden dann abgelöst, verdünnt und in neue Flaschen transferiert. Die Methotrexat-Konzentration wurde nun um den Faktor von etwa 2 - 5 erhöht, z.B. von 20 nM auf 50 und 100 nM, oder von 50 nM auf 100 und 200 nM. Nach mehreren derartigen Selektionszyklen in Gegenwart steigender Mengen an Methotrexat, und Selektionsresistenter Kulturen nach ihrer IFN-Produktion, konnten schließlich Zelllinien erhalten werden, die resistent gegen Methotrexat-Konzentrationen bis zu 5.000 nM waren und relativ große Mengen an IFN- $\alpha$ 2 sezernierten. Die folgende Tabelle I illustriert den Anstieg der Produktivität am Beispiel der Zelllinie CHO-DXB11-IFN- $\alpha$ 2c-3/2D4.

Die nachfolgende Tabelle II zeigt die Ergebnisse mit der Zelllinie CHO-DG44-IFN- $\alpha$ 2c-pool "S":

Tabelle I

IFN- $\alpha$ 2c in Kulturrührständern  
(Einheiten/ml)

Methotrexat-Konzentration  
(nM)

0	6.000	- 14.000
20	12.000	- 89.000
50	29.000	-125.000
100	96.000	-120.000
200	110.000	-190.000
500	140.000	-300.000
1000	350.000	-900.000
2000	200.000	-350.000
5000	210.000	-960.000

77

Tabelle II

Methotrexat-Konzentration (nM)	IFN- $\alpha$ 2c in Kulturüberständen (Einheiten/ml)
20	29.000
50	58.000
100	69.000
200	71.000
500	190.000
1000	170.000
2000	200.000
5000	190.000

Aus Kulturüberständen rekombinanter CHO-Zellen konnte IFN- $\alpha$ 2 mit Hilfe von Affinitätschromatographie an monoklonalen Antikörpern (z. B. den Antikörpern EBI-1 oder EBI-10) nach bereits bekannten Methoden gereinigt werden (z.B. Nature 285, 446-450, 1980; J. Biol. Chem. 265, 9290-9295, 1990; Biochem. J. 276, 511-518, 1991). Zur Reinigung der erfindungsgemäßen Proteine eignet sich in besonderer Weise das in der EPA 0 203 382 beschriebene Verfahren.

## Beispiel 6

Charakterisierung von rekombinantem, glycosyliertem humanem IFN- $\alpha$ 2c aus "Chinese hamster ovary (CHO)"-Zellen.

a) Reverse Phase HPLC (RP-HPLC)

Affinitätsgereinigtes rekombinantes glycosyliertes IFN- $\alpha$ 2c aus CHO-Zellen wurde mittels RP-HPLC mit rekombinantem IFN- $\alpha$ 2c aus E.coli, das nicht glycosyliert ist, verglichen. Die genaue Analysenmethode ist in Adolf et al., J. Biol. Chem. 265, 9290-9295 (1990) beschrieben. Glycosyliertes CHO-IFN- $\alpha$ 2c (oberer Teil von Fig.21) besteht aus zwei Hauptpeaks (Peaks 1 und 2) und zwei kleineren IFN-Peaks (Peaks 3 und 4). Unglycosyliertes E.coli-IFN- $\alpha$ 2c dagegen (unterer Teil von Fig.21) zeigt einen Hauptpeak (korrekte Disulfidbrücken) und einen kleineren Nebenpeak, der von einer Form mit "scrambled" Disulfidbrücken stammt. Aus dem Vergleich der Retentionszeiten sieht man, daß die zwei Hauptpeaks des CHO-IFN- $\alpha$ 2c etwas früher eluieren als der Hauptpeak des E.coli-IFN- $\alpha$ 2c. Der Grund für diese verringerte Hydrophobizität ist die Anwesenheit von Oligosacchariden im CHO-IFN- $\alpha$ 2c. Die zwei kleineren IFN-Peaks im CHO-IFN- $\alpha$ 2c haben etwa die gleiche Retentionszeit wie der Hauptpeak des E.coli-IFN- $\alpha$ 2c und stammen damit höchstwahrscheinlich von einem kleineren unglycosylierten Anteil des CHO-IFN- $\alpha$ 2c.

b) N-terminale Sequenzierung

Die zwei Hauptpeaks des CHO-IFN- $\alpha$ 2c wurden von der RP-HPLC isoliert und gemeinsam sequenziert. Die

Sequenzierbedingungen sind in Adolf et al., J. Biol. Chem. 265, 9290-9295 (1990) beschrieben. Die ersten 15 Aminosäuren konnten in Übereinstimmung mit der cDNA-Sequenz identifiziert werden. Es gab keine Hinweise auf eine Heterogenität am N-Terminus.

### c) C-terminale Analyse

Der Hauptpeak des E.coli-IFN- $\alpha$ 2c und die zwei Hauptpeaks des CHO-IFN- $\alpha$ 2c wurden von der RP-HPLC isoliert und mit Trypsin gespalten. Die tryptischen Peptide wurden wieder mittels RP-HPLC getrennt. Die experimentellen Bedingungen sind in Adolf et al., Biochem. J. 276, 511-518 (1991) beschrieben. Fig.22 zeigt einen Vergleich der erhaltenen Peptide Maps. Zwischen den Peptide Maps von Peak 1 und Peak 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c (oberer und mittlerer Teil) gab es nur einen einzigen Unterschied. Das tryptische Peptid 18 aus Peak 1 ist im Peak 2 (dort als Peptid 15) nahezu nicht vorhanden. Stattdessen wurde ein neues Peptid (Nummer 19) im Map von Peak 2 gefunden, das sowohl im Peak 1 als auch im E.coli-IFN- $\alpha$ 2c (unterer Teil von Fig.22) überhaupt nicht vorkommt.

Die Peptide 12 (aus E.coli-IFN- $\alpha$ 2c), 18 (aus Peak 1 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c), 15 und 19 (aus Peak 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c) wurden mit Plasmadesorptions-Massenspektrometrie (PD-MS) analysiert. Die experimentellen Details dafür sind in Adolf et al., Biochem. J. 276, 511-518 (1991) beschrieben. Für die ersten drei der genannten Proben wurde ein Molekulargewicht gefunden, das den Aminosäuren 150 bis 162 der IFN- $\alpha$ 2c-Sequenz entspricht. Peptid 19 aus Peak 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c ergab dagegen ein geringeres Molekulargewicht, entsprechend den Aminosäuren 150 bis

161. Ein Teil des Peptids 19 wurde auch sequenziert, wobei sich eindeutig zeigte, daß dieses Peptid mit der Aminosäure 150 beginnt und mit LEU-161 endet. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß der Peak 1 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c ein vollständiges IFN-Molekül enthält, während beim Peak 2 die 4 C-terminalen Aminosäuren (162-165) fehlen. Die Aminosäuren 163-165 können in einem Peptide Map nach Trypsinspaltung nicht positiv identifiziert werden, da das daraus resultierende Dipeptid (163/164) und die freie Aminosäure (165) im Totvolumen der RP-Säule eluieren. Der kleine Anteil von Peptid 15 (unverkürztes tryptisches Peptid mit den Aminosäuren 150-162), der auch im Peak 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c gefunden wurde, ist wohl auf einen kontaminierenden Anteil von Peak 1 zurückzuführen, da die Peaks 1 und 2 mittels RP-HPLC nicht vollständig getrennt werden können.

In weiteren Experimenten wurde festgestellt, daß die C-terminale Verkürzung des O-glycosylierten IFN- $\alpha$ 2 aus CHO-Zellen verhindert werden kann, wenn für das Ablösen der Zellen von der Oberfläche der Kulturgefäße an Stelle der üblichen Trypsin/EDTA-Lösung eine trypsinfreie Lösung verwendet wird (z.B. EDTA Dinatriumsalz, 200 mg/L mit D(+)Glucose Monohydrat, 200 mg/L in phosphatgepufferter Natriumchloridlösung pH 7.4). IFN- $\alpha$ 2, das aus derart kultivierten Zellkulturen nach den oben beschriebenen Verfahren gereinigt wurde, zeigte in der Reverse Phase - HPLC (analog zu Abbildung 21a) nur den Peak 1, der dem vollständigen Protein entspricht, aber nicht den Peak 2, der dem verkürzten Protein entspricht. Weiterhin konnte mit Hilfe der tryptischen Peptide Maps (analog zu Abbildung 22) gezeigt werden, daß das Peptid-Muster dieses ohne Verwendung von Trypsin hergestellten Proteins identisch mit dem Muster der aus dem Peak 1 generierten Peptide (Abbildung 22a) ist.

SDS-Gelelektrophorese

Die Peaks 1 and 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c wurden von der RP-HPLC isoliert. Sie wurden einzeln und im Vergleich zu E.coli-IFN- $\alpha$ 2c sowohl unter reduzierenden (nach Kochen mit Dithiothreitol) als auch unter nichtreduzierenden Bedingungen mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert. Die experimentellen Details sind in Adolf et al., J. Biol. Chem., 265, 9290-9295 (1990) beschrieben. Die Ergebnisse sind in Fig.23 gezeigt (Spuren 2-4 unter nichtreduzierenden Bedingungen, Spuren 5-7 unter reduzierenden Bedingungen; oberer Teil mit 4  $\mu$ g IFN in jeder Spur, unterer Teil mit je 1  $\mu$ g IFN). Speziell aus den Spuren 5-7 des unteren Teils ist ersichtlich, daß sowohl Peak 1 als auch Peak 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c ein höheres Molekulargewicht haben als das unglycosylierte E.coli-IFN- $\alpha$ 2c. Wegen der nicht vollständigen Trennung der Peaks 1 und 2 bei der RP-HPLC ist eine gegenseitige Kontamination der Peaks 1 und 2 vorhanden. Aus demselben Grund ist auch der Peak 2 mit einer geringen Menge von unglycosyliertem CHO-IFN- $\alpha$ 2c, das aus Peak 3 (siehe Fig.21) stammt, kontaminiert. Unter Berücksichtigung dieser Kontaminationen scheinen die Hauptbanden der Peaks 1 und 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c homogen zu sein. Da sich die Peaks 1 und 2 bezüglich des C-Terminus unterscheiden (siehe oben), kann aus den Ergebnissen der SDS-Gelelektrophorese geschlossen werden, daß die Oligosaccharid-Anteile der Peaks 1 und 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c identisch sind (siehe auch später in Kapitel f).

e) Deglykosylierung von CHO-IFN- $\alpha$ 2c

Die Peaks 1 and 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c wurden von der RP-HPLC isoliert und in einem SpeedVac Konzentrator getrocknet. Diese Proben sowie E.coli-IFN- $\alpha$ 2c wurden in 10  $\mu$ l 0,1 M NaOH 20 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die durch diese  $\beta$ -Elimination deglycosylierten Proben wurden im Vergleich zu unbehandelten Proben mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert. Die Ergebnisse in Fig.24 zeigen, daß das Molekulargewicht der Peaks 1 und 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c nach Behandlung mit NaOH deutlich reduziert und identisch mit dem des NaOH-behandelten E.coli-IFN- $\alpha$ 2c ist. Das diffuse Aussehen der Banden aller mit NaOH behandelten Proben ist auf Veränderungen in der Peptidkette unter den angewandten Reaktionsbedingungen zurückzuführen.

f) Identifizierung der Glykopeptide mittels Peptide Mapping

Der Vergleich der Peptide Maps nach Trypsinspaltung von E.coli-IFN- $\alpha$ 2c (Fig.22, unterer Teil) und von Peak 1 (vollständiger C-Terminus) des CHO-IFN- $\alpha$ 2c (Fig.22, oberer Teil) zeigt, daß jeweils zwei Peptide unterschiedliche Retentionszeiten aufweisen. Die Peptide 18 und 21 von E.coli-IFN- $\alpha$ 2c, die die Aminosäuren 84-112 bzw. 71-112 enthalten, kommen im Peptide Map von Peak 1 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c nicht vor. Stattdessen gibt es dort zwei neue Peptide (Nummer 26 und 31), die das gleiche Verhältnis der Absorptionen bei 280 und 214 nm zeigen wie die Peptide 18 und 21 von E.coli-IFN- $\alpha$ 2c. Man kann daraus folgern, daß die Peptide 26 und 31 die glycosylierten Versionen der Aminosäuresequenzen 84-112 bzw. 71-112 darstellen.

Daher eluieren sie auch deutlich früher von der RP-Säule als die analogen Peptide von E.coli-IFN- $\alpha$ 2c. Für die beiden möglichen Längen der tryptischen Peptide (Aminosäuren 84-112 bzw. 71-112) gibt es jeweils einen Hauptpeak (Peptid 26 bzw. 31), woraus geschlossen werden kann, daß der Oligosaccharid-Anteil weitgehend homogen ist.

Aus dem Vergleich der Peptide Maps der Peaks 1 und 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c (oberer und mittlerer Teil von Fig.22) ist ersichtlich, daß die jeweiligen Glycopeptide (26 und 31 aus Peak 1 bzw. 24 und 30 aus Peak 2) identisch sind. Daraus folgt ebenfalls, daß die vier fehlenden Aminosäuren am C-Terminus von Peak 2 den einzigen Unterschied zwischen den Peaks 1 und 2 darstellen.

Alle die Aminosäuresequenzen 84-112 bzw. 71-112 betreffenden Hauptpeptide der drei IFN-Proben wurden von RP-HPLC isoliert und mit Staphylococcus Aureus V8 Protease an der C-terminalen Seite von Glutaminsäure weitergespalten. Die exakten Bedingungen sind in Adolf et al., Biochem. J. 276, 511-518 (1991) beschrieben. Die resultierenden Peptide Maps wurden verglichen, alle unterschiedlichen Peaks wurden isoliert und mittels N-terminaler Sequenzierung und/oder Massenspektrometrie weiter analysiert.

Eines der in den Peaks 1 und 2 des CHO-IFN- $\alpha$ 2c, aber nicht in E.coli-IFN- $\alpha$ 2c vorkommenden Staph.A.-Peptide enthielt die Aminosäuren 97-112 der IFN- $\alpha$ 2c-Sequenz. Über die N-terminalen Sequenzierung konnte in diesem Peptid THR-106 nicht identifiziert werden. Daraus kann geschlossen werden, daß THR-106 in diesem Peptid glycosyliert vorliegt. Bei der hier verwendeten Edman-Sequenzierung werden glycosylierte Aminosäuren

derivatisiert und abgespalten wie unglycosylierte Aminosäuren, sie können jedoch wegen ihrer erhöhten Hydrophilizität mit Butylchlorid nicht aus dem Reaktionsgefäß extrahiert werden. Daher kann man in diesem Abbauschritt keinerlei Aminosäure identifizieren, die Sequenz geht jedoch danach völlig ungestört weiter. Ein weiterer Hinweis darauf, daß das Oligosaccharid an THR-106 gebunden ist, ergab sich aus dem Resultat, daß die GLU-107/THR-108-Bindung durch die Staph.A.-Protease nur teilweise gespalten wurde. Offensichtlich ist die Zugänglichkeit dieser Peptidbindung durch die Anwesenheit des Oligosaccharids eingeschränkt. In dem analogen Peptid aus E.coli-IFN- $\alpha$ 2c wird diese Peptidbindung nahezu vollständig gespalten.

Ein weiteres Staph.A.-Peptid, das nur in CHO-IFN- $\alpha$ 2c vorkommt, wurde mittels Plasmadesorptions-Massenspektrometrie analysiert. Das erhaltene Molekulargewicht entsprach den Aminosäuren 97-112 inklusive einem Oligosaccharid, bestehend aus je einem Molekül N-Acetylgalactosamin und Galactose sowie zwei Molekülen N-Acetylineuraminsäure.

Aus diesem Resultaten ist ersichtlich, daß sowohl die Glycosylierungsstelle als auch der Oligosaccharidanteil des CHO-IFN- $\alpha$ 2c weitgehend identisch sind mit den in natürlichem IFN- $\alpha$ 2 aus virusstimulierten Leukocyten gefundenen Verhältnissen.

Isolierung des O-glycosylierten Interferons aus virusstimulierten Zellen:

Methoden

Interferon Bioassay: Die antivirale Aktivität der IFN Präparationen wurde in einem Assay, der den cytopathischen Effekt (CPE) von Enzephalomyocarditis Virus (EMCV) mißt, in Mikrotiterplatten durchgeführt. Als Testzellen werden die A549 humanen Lungencarcinomzellen verwendet. Details dieses Assays sind beschrieben worden (z.B. Adolf, G.R., J.Gen.Viro. 68, 1669-1676 (1987)). Bei jedem Bioassay wurden alle Titrationen zweimal durchgeführt. Eine Laborstandard-Präparation an rekombinantem in E. coli produziertem humanem IFN- $\alpha$ 2c wurde in jedem Assay mitgeführt: die Aktivität dieser Präparation wurde kürzlich durch Vergleich mit der internationalen Referenzpräparation für human IFN- $\alpha$ 2, Gxa 01-901-535 ermittelt. Alle beobachteten IFN-Aktivitäten wurden korrigiert im Hinblick auf die definierte Wirksamkeit dieser Referenzpräparation.

Interferon ELISA: Ein ELISA wurde etabliert, der zwei neutralisierende murine IgG MAbs für IFN- $\alpha$  und eine IFN- $\alpha$ 2c Laborreferenzpräparation (s. oben) als Standard verwendet. Die Herstellung der Antikörper und ihre Eigenschaften sind beschrieben (Adolf et al. J. Cell Physiol. suppl. 2, 61-68 (1982); Adolf G.R. J. Gen. Virol. 68, 1669-1676 (1987)). Der Antikörper EBI-1 wurde zur Beschichtung der Assay Platten verwendet; der Antikörper EBI-10, kovalent gekoppelt an Meerrettich Peroxidase, wurde mit der zu untersuchenden Probe zugegeben, O-Phenylendiamin und Natriumperborat wurden als Substrate für das Enzym verwendet; die Reaktion wurde durch Zugabe von Schwefelsäure unterbrochen und die Absorption des resultierenden Produktes gemessen (492 nm, Referenz 690 nm).

Reinigung des natürlichen human IFN- $\alpha$ 2:

Eine Affinitätssäule wurde durch Kopplung von 12 mg des monoklonalen Antikörpers, beispielsweise des MAbs EBI-10 (gereinigt aus dem Maus-Ascites durch Ammoniumsulfat Präzipitation und Protein G Affinitätschromatographie nach Standardmethoden) an 1g CNBr-aktivierter Sepharose 4B nach den Empfehlungen des Herstellers (Pharmacia) hergestellt. Das endgültige Bettvolumen der Säule betrug annähernd 3 ml. Teilweise gereinigtes human Leukozyteninterferon (Cantell et al. Methods Enzymol. 78, 29-38 (1981); Cantell et al. ibid. 499-505) bei dem der IFN- $\alpha$  Anteil entfernt worden war (Adolf et al. J. Biol. Chem. 265, 9290-9295 (1990)) und das etwa  $2-3 \times 10^6$  IU/ml mit einer totalen Protein Konzentration von 2 mg/ml enthielt, wurde mit einer Durchflußrate von 1 ml/Min auf die Säule aufgetragen (200 und 350 ml). Die Säule wurde dann mit 0,1 M Natriumphosphat Puffer pH 7,5 (Puffer A) gewaschen und mit einem Lineargradienten aus Puffer A und Puffer B (0,1 M Natriumcitrat pH 2,1) in einem FPLC-System (Pharmacia) bei einer Durchflußrate von 1 ml/Min eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf IFN-Aktivität mit Hilfe des ELISA geprüft. Entsprechende Fraktionen beider Ansätze wurden gesammelt, mit 1 M NaOH neutralisiert und erneut auf dieselbe Säule aufgetragen, die mit Puffer A reäquilibriert worden war. Dasselbe Elutionsprogramm wurde verwendet. (Durchflußrate 0,25 ml/Min) Entsprechende Fraktionen wurden wieder gesammelt, neutralisiert und in Aliquots eingefroren.

SDS Gelelektrophorese, HPLC-Techniken und Aminosäuresequenzierungen: SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese und Reverse Phase HPLC wurden

verwendet um das gereinigte IFN- $\alpha$ 2 zu analysieren; sämtliche Methoden sind ausführlich beschrieben worden (Adolf et al., J. Biol. Chem. 265, 9290-9295 (1990)). Die Bestimmung der N-terminalen Sequenz wurde in einem automatischen Sequenator (Applied Biosystems, Modell 477A) durchgeführt; Aminosäurederivate wurden on-line durch RP-HPLC analysiert (Adolf et al., J. Biol. Chem. 265, 9290-9295 (1990)).

"Mapping" der proteolytischen Peptide:

Affinitätsgereinigtes IFN- $\alpha$ 2 wurde weiterhin durch Reverse Phase HPLC gereinigt, denaturiert und entsalzt wie bei Adolf et al., J. Biol. Chem. 265, 9290-9295 (1990) beschrieben. Die Peakfraktionen wurden gesammelt und in einem SpeedVac Konzentrierer getrocknet. 29  $\mu$ g (Peak 1) und 66  $\mu$ g (Peak 2) Protein wurden in 0,1 ml 1%iger Ammoniumbicarbonatlösung aufgelöst; 0,5 bzw. 1  $\mu$ g Trypsin (Boehringer Mannheim) in 3 bzw. 6  $\mu$ l 0,01 %iger Trifluoressigsäure wurden zugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei 37°C inkubiert. Nach 6 h Inkubationszeit wurde dieselbe Menge Trypsin erneut zugegeben und für weitere 18 h inkubiert. Die Reaktionsmischung wurde vor der Analyse durch Zugabe von 10  $\mu$ l 0,5 M Dithiothreitol und 100  $\mu$ l 6 M Harnstoff 2 h bei Raumtemperatur reduziert. Reverse Phase HPLC wurde auf einer Delta Pak C18 Säule (Waters; 3,9 x 150 mm; Teilchengröße 5  $\mu$ m; Porendurchmesser 100 $^{\circ}$ A) bei 30°C unter Verwendung folgender Lösungsmittel durchgeführt: Lösungsmittel A: 0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser; Lösungsmittel B: 0,1 % Trifluoressigsäure in Acetonitril. Das folgende Gradientenprogramm wurde verwendet (Durchflußrate 1 ml/Min): 0-55 Min: 0-55 % B (linearer Gradient); 55-70 Min: 50 % B. Detektiert wurden die Peptide durch ihre Absorption bei 214 und 280 nm. Die resultierenden

Muster wurden mit denen des rekombinanten aus *E. coli* stammenden IFN- $\alpha$ 2c verglichen. Die Peptide des natürlichen IFN- $\alpha$ 2, die sich in ihrem Elutionsverhalten anders verhielten als ihre rekombinanten Gegenstücke wurden gesammelt und N-terminal sequenziert oder wurden mit *Staphylococcus aureus* V8 Protease weiter abgebaut (Endopeptidase Glu-C, Boehringer Mannheim). 0,88  $\mu$ g (Peak 1/I), 2,6  $\mu$ g (Peak 2/Ia) und 1,5  $\mu$ g (Peak 2/Ib) der Peptide wurden jeweils in 0,1 ml 25 mM Phosphatpuffer pH 7,8 gelöst. In Wasser gelöste Protease wurde zugegeben (17,5 ng, 52,5 ng bzw. 29 ng) und die Reaktionsmischung wurde bei 37°C inkubiert. Nach 6 h wurden dieselben Mengen Protease erneut zugegeben und 18 h inkubiert. Die Proben wurden daraufhin einer Reverse Phase HPLC Analyse unterzogen (s. oben). Entsprechende Fraktionen -- wurden gesammelt und N-terminal sequenziert.

Deglykosylierung des IFN- $\alpha$ 2: Gereinigtes, denaturiertes und entsalztes IFN- $\alpha$ 2 wurde mit *Vibrio cholerae* Neuraminidase (Boehringer Mannheim) (50 mU/ml, 18 h bei 37°C in 20  $\mu$ l 50 mM Natriumacetat pH 5,5, 4 mM  $\text{CaCl}_2$ ) und/oder Endo- $\alpha$ -N-acetyl-galactosaminidase -ist gleich O-Glycanase- (Boehringer Mannheim) (100 mM/ml, 18 h bei 37°C im selben Puffer) behandelt. Chemische Eliminierung wurde durch Inkubation in 0,1 M NaOH 20 h bei Raumtemperatur erreicht.

Plasmadesorptions-Massenspektrometrie:

Massenspektren der tryptischen Peptide wurden auf einem "BIO-ION 20 time-of-flight" Massenspektrometer (BIO-ION Nordic AB, Uppsala, Schweden) gemessen. Die Proben wurden in wässriger Trifluoressigsäure (0,1 %) gelöst und auf Nitrozellulose-beschichtete Targets aufgebracht (BIO-ION). Die spektralen Akkumulationszeiten bewegten

sich zwischen 0,5 und 12 h, abhängig von der Ausbeute. Die Spektren wurden gemessen bei einer Beschleunigungsspannung von 17 kV.

Beispiel 7:

Reinigung des natürlichen human IFN- $\alpha$ 2

Humanes Leukozyten-Interferon, erhalten aus Sendai Virus induzierten humanen peripheren Leukozyten und teilweise gereinigt nach dem Reinigungsverfahren von Cantell et al. (Methods Enzymol 78, 29-38 und 78, 499-512 (1981)), wurde als Ausgangsmaterial für die Isolierung und Reinigung des IFN- $\alpha$ 2 verwendet. Durch selektive Affinitätschromatographie mit Anti IFN- $\omega$  monoklonalen Antikörper, beispielsweise OMG-4, OMG-5 oder OMG-7 war der Anteil an IFN- $\omega$  entfernt worden (Adolf et al. Virology 175, 410-417 (1990); EPA 262 571). Die spezifische antivirale Aktivität betrug  $1-2 \times 10^6$  IU/mg; IFN- $\alpha$ , mit einer spezifischen Aktivität von  $2 \times 10^8$  IU/mg war demnach nur mit etwa 1% des gesamten Proteinanteils vertreten. Zur Reinigung des IFN- $\alpha$ 2 von kontaminierenden Fremdproteinen und gleichzeitig von anderen IFN- $\alpha$  Spezies wurden hoch selektive Anti IFN- $\alpha$ 2 monoklonale Antikörper verwendet. Diese Antikörper besitzen in standardisierten Neutralisations-Bioassays hohe Spezifität für das IFN- $\alpha$ 2 (Adolf G.R. J. Gen. Virol. 68, 1669-1676 (1987)).

Eine Immunoaffinitätssäule wurde hergestellt, indem ein solcher monoklonaler Antikörper, beispielsweise der EBI-10 hergestellt z.B. gemäß J. Gen. Virol. 68, 1669-1676 (1987) oder DE 33 06 060.6 an CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppelt wurde. Der Antikörper war aus dem Maus-Ascites durch Ammoniumsulfat Präzipitation und

Protein G Affinitätschromatographie nach Standardverfahrensweisen gereinigt worden. Verwendet wurden beispielsweise 12 mg des monoklonalen Antikörpers EBI-10, die an Ig CNBr-aktivierter Sepharose 4B gekoppelt wurden, wobei die vom Hersteller empfohlenen Bedingungen eingehalten wurden (Pharmacia). Das endgültige Bettvolumen der Säule betrug etwa 3 ml.

Die Leukozyten-Interferon Präparation wurde auf die Säule aufgetragen; ungefähr 20% der antiviralen Aktivität wurden gebunden. Die Säule wurde mit einem linearen Puffergradienten aus 0,1 M Natriumphosphat, pH 7,5 und 0,1 M Natriumcitrat pH 2,1 eluiert. Zwei Proteinpeaks konnten im Eluat festgestellt werden (Fig. 12): Fraktion A und Fraktion B. Beide Fraktionen wurden auf ihren Gehalt an IFN- $\alpha$  analysiert, wobei ein "zwei-Seiten ELISA" verwendet wurde, bei dem sowohl EBI-10 als auch EBI-1 verwendet wurde. Beide Antikörper zeigen hohe Spezifität für IFN- $\alpha$ 2 (Adolf et al. J. Cell Physiol. suppl. 2, 61-68 (1982)). Rekombinantes IFN- $\alpha$ 2c wurde als Standard verwendet. Die Fraktion, die bei niedrigem pH eluiert worden war (Fig. 12, Peak "A"), ebenso wie die Probe ergaben Titrationskurven, die parallel zu der Titrationskurve des rekombinanten IFN- $\alpha$ 2c verliefen. Der Durchlauf und Fraktionen des 1. Peaks ("B") ergaben Kurven mit verschiedenen Steigungen; sie konnten daher nicht durch den ELISA quantifiziert werden (Fig. 13), sondern wurden im biologischen Assay überprüft (Tabelle III).

Der niedrige, zur Elution des Peak "A" erforderliche pH, ebenso wie die Ergebnisse des ELISA deuteten darauf hin, daß IFN- $\alpha$ 2 ein Hauptbestandteil des Peak "A" war. Um sicherzustellen, daß sämtliches immunreaktives IFN- $\alpha$  durch den Antikörper gebunden worden war, wurde der Durchlauf erneut über die Säule gegeben und wie

oben beschrieben ein zweites Mal eluiert. Das eluierte Material ergab weniger als 10% der IFN-Aktivität, die beim ersten Durchlauf gebunden worden war.

Sowohl die Fraktionen "A" als auch "B" wurden getrennt gesammelt, neutralisiert und erneut einer chromatographischen Reinigung auf derselben Affinitätssäule unterzogen. In beiden Fällen wurde mehr als 95% der IFN-Aktivität gebunden; Elution erfolgte an derselben Gradientenposition wie im ersten Zyklus. Ausgangsprodukt, Durchlauf und die gesammelten Fraktionen beider Chromatographien wurden durch Coomassie Blau Färbungsassays auf ihren Proteingehalt und durch einen antiviralen Bioassay auf ihren IFN-Aktivitätsgehalt hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle III zusammengefaßt:

Tabelle III  
Reinigung des natürlichen IFN- $\alpha$ 2

	Volumen ml	Protein mg/ml	antivirale Aktivität $\times 10^{-6}$		Ausbeute %
			IU/ml <sup>1</sup>	IU total	
P-IF <sup>2</sup>	550	1,7	2,8	1540	100
1. Zyklus Durchfluß	550	1,7	2,2	1216	79
1. Zyklus Eluat A	18	0,08	9,6	172	11
1. Zyklus Eluat B	17	0,05	4,3	73	4,8
2. Zyklus Eluat A	8	0,1	12	96	6,2
2. Zyklus Eluat B	4	0,1	13	54	3,5

<sup>1</sup> Mittelwert von 5 verschiedenen Bioassays

<sup>2</sup> teilweise gereinigtes humanes Leukocyten IFN nach Entfernung  
des IFN- $\alpha$ 1

## Beispiel 8:

Identifizierung des Affinitäts-gereinigten Proteins als  
IFN- $\alpha$ 2

Das Affinitäts-gereinigte IFN- $\alpha$  wurde zunächst durch Reverse Phase HPLC analysiert und gereinigt. Peak "A" zeigte zwei unvollständig aufgelöste Peaks "1" und "2" mit einem Massenverhältnis von etwa 1:2 (Fig. 14 unten); Peak "1" repräsentierte eine mehr hydrophile Proteinfraktion. Beide Peakfraktionen wurden gesammelt, rechromatographiert und einer N-terminalen Aminosäureanalyse unterzogen. Die nachfolgende Sequenz wurde aus beiden Fraktionen erhalten (die Cys-Reste in Klammern wurden nicht identifiziert, sondern auf der Basis der konservierten IFN-Sequenzen abgeleitet):

[<sup>1</sup>CYS]-ASP-LEU-PRO-<sup>5</sup>GLN-THR-HIS-SER-LEU-<sup>10</sup>GLY-SER-  
ARG-ARG-THR-<sup>15</sup>LEU-MET-LEU-LEU-ALA-<sup>20</sup>GLN-MET-ARG-  
<sup>23</sup>ARG-ILE-<sup>25</sup>SER-LEU-PHE-SER-[CYS]-<sup>30</sup>LEU-

Durch Vergleich mit publizierten Sequenzen wurden beide als IFN- $\alpha$ 2 identifiziert.

In beiden Peakfraktionen "1" und "2" wurde die Aminosäure an Position 23 eindeutig als Arginin identifiziert; die als LeIFa bezeichnete Variante, die an Position 23 Lysin aufweist (Goeddel et al., Nature, 290, 20-26 (1981)), war demnach in der verwendeten Leukozytenpräparation in nachweisbaren Mengen nicht vorhanden. Die Aminosäure an Position 34 wurde als Histidin identifiziert; das isolierte IFN- $\alpha$ 2 war demnach die Variante IFN- $\alpha$ 2b.

Die spezifische antivirale Aktivität des natürlichen IFN- $\alpha$ 2 bezogen auf die internationale Referenzpräparation für IFN- $\alpha$ 2, Gxa01-901-535, basierend auf einer Bestimmung des Proteingehaltes der Probe durch dessen Absorption bei 214 nm (Adolf et al., *Virology* 175, 410-417 (1990), wurde zu  $1,5 \times 10^8$  IU/mg bestimmt (Mittelwert aus fünf unabhängigen Bioassays).

Bei einem Vergleich der Retentionszeiten des natürlichen IFN- $\alpha$ 2 auf der Reverse Phase HPLC mit der des rekombinanten *E. coli* IFN- $\alpha$ 2c wurde offensichtlich, daß das rekombinante Protein signifikant später eluiert wurde (Fig. 14). Die erhöhte Hydrophilizität des natürlichen Proteins ebenso wie dessen Heterogenität muß daher mit posttranslationalen Modifikationen zusammenhängen.

Reverse Phase HPLC des Elutionspeaks "B" ergab ein kompliziertes Muster von fünf unvollständig aufgelösten Peaks. Sequenzanalysen ergaben, daß sämtliche Peaks IFN- $\alpha$  Spezies darstellten, keiner jedoch IFN- $\alpha$ 2 repräsentierte.

Das durch HPLC gereinigte IFN- $\alpha$ 2 wurde weiterhin durch SDS-PAGE nach Reduktion mit Dithiothreitol analysiert (Fig. 20). Unter den gewählten Bedingungen zeigte das rekombinante IFN- $\alpha$ 2c von *E. coli* ein scheinbares Molekulargewicht von 17.500 D (Molekulargewicht ausgehend von der Aminosäuresequenz: 19.287 D). HPLC-Peakfraktion "1" gab ein einziges relativ breites Band (scheinbares Molekulargewicht 20.000 D) während Peakfraktion "2" in zwei Hauptkomponenten (20.000 bzw. 19.000 D) und in eine Nebenkomponente (21.000 D) aufgespalten wurde. Diese Molekulargewichtsunterschiede im Vergleich zum

rekombinanten Protein aus *E. coli*, die Größenheterogenität wie auch die erhöhte Hydophilizität deuten darauf hin, daß das natürliche IFN- $\alpha$ 2 glycosyliert ist. Da keine Erkennungsstelle für eine N-Glycosylierung in der IFN- $\alpha$ 2 Struktur vorhanden ist, muß O-Glycosylierung vorliegen.

Beispiel 9:

Reaktion von natürlichem IFN- $\alpha$ 2 mit Endo- und Exoglycosidasen

Die folgenden Versuche wurden jeweils mit beiden Peaks nach Trennung über RP-HPLC (Peaks 1 und 2 aus Fig. 14b) durchgeführt. Beide Proben wurden mit Neuraminidase und anschließend mit O-Glycanase inkubiert. Nach jeder Enzymreaktion wurde ein Aliquot mittels SDS-PAGE untersucht.

Wie in Fig. 16 zu sehen ist, reagierte Peak 1 weder mit Neuraminidase noch mit O-Glycanase. Die scheinbare molekulare Masse blieb mit 20.000 konstant. Die drei Banden des Peaks 2 hingegen reagierten sowohl mit Neuraminidase als auch anschließend mit O-Glycanase. Die Reaktion mit Neuraminidase bewirkte eine Reduktion der scheinbaren molekularen Masse der beiden schwereren Banden (Mr 21.000 und 20.000) auf 19.000. Spuren der Bande mit der scheinbaren molekularen Masse von 20.000 blieben jedoch zurück. Anschließende Inkubation des Proteins mit O-Glycanase führte zu einer weiteren Reduktion der scheinbaren molekularen Masse von 19.000 auf 17.500 (= scheinbare molekulare Masse von *E. coli*-IFN- $\alpha$ 2c). Die Komponente mit Mr 19.000 wurde dabei vollständig abgebaut. Nach wie vor blieben geringe Mengen der Bande mit der scheinbaren molekularen Masse von 20.000 detektierbar. Da die

Trennung der beiden Peaks 1 und 2 aus Fig. 14b mittels RP-HPLC nicht vollständig war, ist der nicht spaltbare Anteil der Bande mit Mr 20.000 wahrscheinlich auf eine Verunreinigung des Peaks 2 mit Peak 1 zurückzuführen.

In einem weiteren Versuch wurde Peak 2 mit O-Glycanase inkubiert, ohne zuvor mit Neuraminidase behandelt worden zu sein (O-Glycanase spaltet das Disaccharid Gal(β1-3)GalNAc nur dann vom Protein ab, wenn dieses durch keine weiteren Verbindungen substituiert ist). Das Reaktionsprodukt wurde wieder mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Fig. 17). Man erkennt hier deutlich, daß nur die leichteste Komponente des Peaks 2 eine Reduktion ihrer molekularen Masse erfährt (Reduktion von Mr 19.000 auf Mr 17.500). Die scheinbaren molekularen Massen der beiden schwereren Komponenten (Mr 21.000 und 20.000) blieben unverändert.

Beispiel 10:

Reaktion von natürlichem IFN- $\alpha$ 2 mit 0,1 M NaOH

Da O-Glycosylierungen schon unter milden alkalischen Bedingungen abbaubar sind, wurde versucht, die O-Glycanase-resistente Komponente (Peak 1 aus Fig. 14b) mittels Inkubation mit 0,1 M NaOH zu deglycosylieren. Die Reaktion erfolgte wie oben beschrieben. Gleichzeitig wurde als Kontrolle E. coli-IFN- $\alpha$ 2c und Peak 2 unter denselben Bedingungen inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Wie in Fig. 18 ersichtlich ist, wurden die molekularen Massen aller Komponenten von natürlichem IFN- $\alpha$ 2 auf die scheinbare molekulare Masse von E. coli-IFN- $\alpha$ 2 reduziert. Die Unschärfe der Proteinbanden ist auf die unter den geschilderten Bedingungen geringfügigen Zerstörungen des Proteins zurückzuführen. Auch die

Banden im höhermolekularen Bereich ( $Mr > 30.000$ ) traten als Folge der alkalischen Behandlung auf.

Beispiel 11:

Identifizierung der Glycopeptide mittels Peptide Mapping

Die beiden Peaks von natürlichem IFN- $\alpha 2$  (Fig. 14b) sowie E. coli-IFN- $\alpha 2c$  wurden mit Trypsin gespalten, reduziert und über RP-HPLC aufgetrennt. In Fig. 19 sind Ausschnitte der Chromatogramme zu sehen. Zwei Peaks aus dem Peptide Map von E. coli-IFN- $\alpha 2c$  fallen dabei wegen ihrer Hydrophobizität (und daher relativ späteren Elution) gegenüber den analogen Peaks aus dem natürlichen IFN- $\alpha 2$  auf: Peak I und Peak II (im Peptide Map des E. coli-IFN- $\alpha 2c$ ) wurden deutlich später eluiert als ihre korrespondierenden Peaks 1/I und 1/II vom Peak 1 aus Fig. 14b bzw. Peaks 2/Ia, 2/Ib, 2/IIa und 2/IIb vom Peak 2 aus Fig. 14b.

N-terminale Sequenzierung der erwähnten Peaks von natürlichem IFN- $\alpha 2$  sowie der beiden E. coli-Peaks ergab für die Peaks I, 1/I, 2/Ia, 2/Ib (aus Fig. 19) die Sequenz des Peptides von Aminosäure (AS) 84-112 und für die Peaks II, 1/II, 2/IIa, 2/IIb die Sequenz von AS 71-112 (Die Aminosäuresequenz von IFN- $\alpha 2c$  ist in Fig. 15 dargestellt). Die unterschiedlichen Retentionszeiten mußten also auf eine Glycosylierung der Peptide aus natürlichem IFN- $\alpha 2$  zurückzuführen sein.

Beispiel 12:

Plasmadesorptions Massenspektrometrie der Glycopeptide von natürlichem IFN- $\alpha 2$

Die Peaks 1/II, 2/Ia, 2/IIa und 2/IIb wurden weiterhin

mit Hilfe von PD-MS charakterisiert. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle IV zusammengefaßt. Die Differenz der aus der Aminosäure-Sequenz errechneten molekularen Massen und den tatsächlich erhaltenen molekularen Massen der einzelnen Peptide lassen sich mit unterschiedlichen Glycanstrukturen erklären: Die molekulare Masse des Peptides 1/II, das von der O-Glycanase-resistanten Form des IFN- $\alpha$ 2 erhalten wurde, entspricht der molekularen Masse des Peptides (AS 71-112), das mit einem Tetrasaccharid, bestehend aus zwei N-Acetylhexosamineinheiten und zwei Hexoseeinheiten, substituiert ist. In Analogie zu bereits beschriebenen Strukturen solcher O-Glycane dürfte es sich hier um ein Oligosaccharid mit folgender Struktur handeln : Gal-3(Gal-4GlcNAc-6)GalNAc-.

Peptid 2/Ia wies eine molekulare Masse von 3.975 amu auf, was mit der Substitution des Peptides mit dem Trisaccharid NeuAc-Gal-GalNAc erklärbar ist. Dieselbe Glycanstruktur lässt sich aus der molekularen Masse des Peptides 2/IIa (5.448 amu) ableiten. Für Peptid 2/IIb wurde ein Wert von 5.132 amu gemessen, was einer Glycosylierung mit dem Disaccharid Gal-GalNAc entspricht.

Prinzipiell wiesen alle analysierten Peaks eine um ca. 23 amu erhöhte molekulare Masse auf. Das ist durch Anlagerung von  $\text{Na}^+$ -Ionen an das Peptid erklärbar. Diese Verunreinigungen hätten durch intensives Waschen der Targets vor der Messung vermieden werden können, wurden aber im speziellen Fall in Kauf genommen um Verluste der Glycopeptide gering zu halten. Aus den Ergebnissen des Glycosidase-Abbaues (s. oben) und den massenspektrometrischen Messungen können die in Tabelle IV angeführten Glycanstrukturen abgeleitet werden. Die kleinen Peaks, die im Bereich der Glycopeptide im Peptide Map zu sehen sind, können von weiteren Glycosylierungsvarianten stammen.

Tabelle IV

Peak <sup>1</sup>	Peptid (Amino- säure- nummer)	Molekulare Masse (amu) <sup>2</sup>	Vorgeschlagene Glycan- struktur	Masse <sup>3</sup>
1/II	71-112	5.485	4.736	749
				-GalNAC-Gal
				752
			G1cNAC-Gal	
2/Ia	84-112	3.975	3.304	671
				-GalNAC-Gal-NeuAc
				678
2/IIa	71-112	5.448	4.736	712
				-GalNAC-Gal-NeuAc
				678
2/IIb	71-112	5.132	4.736	396
				-GalNAC-Ga1
				387

Tabelle IV : Molekulare Massen einiger Glycopeptide von natürlichem IFN- $\alpha 2$  mit den entsprechenden vorgeschlagenen Glycanstrukturen. (1) Peaknummern entsprechend Fig. 19; (2) amu, atomare Masseneinheit; (3) berechnete Masse inklusive eines  $\text{Na}^+$ -Ions

Beispiel 13:

Identifizierung der O-glycosylierten Aminosäure mittels  
Gasphasensequenzierung

Da die durch Spaltung mit Trypsin erhaltenen Glycopeptide zu lang waren, um ihre gesamte Sequenz zu bestimmen, wurden diese Peptide mittels *Staphylococcus aureus* Protease V8 weiter gespalten und über RP-HPLC aufgetrennt. Mit dem entsprechenden Peptiden aus *E. coli*-IFN- $\alpha$ 2c wurde ebenso verfahren. Nach Vergleich der Peptide Maps wurden alle Peptide mit unterschiedlicher Retentionszeit isoliert und sequenziert. Alle Glycopeptide aus natürlichen IFN- $\alpha$ 2 enthielten die Aminosäuren 97-112. Während im *E. coli*-IFN- $\alpha$ 2c-Peptid  $^{106}$ THR nachgewiesen werden konnte, war es in den Peptiden aus natürlichem IFN- $\alpha$ 2 nicht nachweisbar. Damit konnte  $^{106}$ THR als Glycosylierungsstelle identifiziert werden.

## Patentansprüche

1. Interferon alpha, dadurch gekennzeichnet, daß es O-glycosyliert ist und im wesentlichen die biologischen und/oder immunologischen Eigenschaften eines IFN- $\alpha$ 2 aufweist, vorzugsweise daß es das O-glycosylierte humane IFN- $\alpha$ 2a, IFN- $\alpha$ 2b oder IFN- $\alpha$ 2c ist.
2. Interferon alpha gemäß Anpruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Threonin-106 (THR-106) O-glycosyliert ist.
3. Interferon alpha gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Oligosaccharid bevorzugt das neutrale Disaccharid Gal-GalNAC, dessen mono- oder disialylierte Variante oder das neutrale Tetrasaccharid Gal-(Gal-GlcNAC-)GalNAC ist.
4. Verfahren zur Herstellung eines Interferon alpha gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
  - a) Leukozyten, vorzugsweise humane Leukozyten mit Virus induziert werden,
  - b) daß das induzierte Interferon alpha durch eine Kaskade schonender, proteinfällender/ proteinlösender Schritte gereinigt wird, wobei der pH den Wert 8,0 nicht überschreiten soll ("Cantell"-Verfahren),
  - c) daß die nach a) oder b) erhaltene Interferonmischung an eine Immunoaffinitätssäule mit einem Anti-IFN- $\alpha$ 2 monoklonalen Antikörper gebunden wird,

- d) daß das gebundene Protein durch geeignete Maßnahmen eluiert wird,
- e) daß das eluierte Protein gesammelt und gegebenenfalls mehrmals über eine Immunoaffinitätssäule gereinigt wird.

5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß als Anti-IFN- $\alpha$ 2 monoklonaler Antikörper der EBI-10 oder dessen Analoga verwendet wird.

6. Verfahren zur Herstellung eines Interferon alpha gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sich an die Stufe e) eine weitere chromatographische Reinigung anschließt.

7. Verfahren zur Herstellung eines Interferon alpha gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) in ein für die Transfektion von Zellen multizellulärer Organismen geeignetes Expressionsplasmid eine für IFN- $\alpha$  kodierende DNA eingefügt wird,
- b) daß mit dem so erhaltenen Expressionsplasmid Zellen multizellulärer Organismen, vorzugsweise Wirbeltierzellen transfiziert werden,
- c) daß die transfizierten Organismen in einem geeigneten Medium kultiviert werden,

- d) daß der Zellüberstand geerntet,
- e) daß das O-glycosyierte IFN- $\alpha$  isoliert und in an sich bekannter Weise gereinigt wird.

8. Verfahren gemäß Anpruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das unter a) eingesetzte Expressionsplasmid das pAD-CMV13, 15 oder 19 vorzugsweise das pAD-CMV19 ist, und daß die unter a) einzufügende DNA für ein Protein kodiert, das im wesentlichen die biologischen und/oder immunologischen Eigenschaften eines IFN- $\alpha$ 2 aufweist, vorzugsweise für ein humanes IFN- $\alpha$ 2a, IFN- $\alpha$ 2b oder IFN- $\alpha$ 2c, insbesondere für humanes IFN- $\alpha$ 2c kodiert.

9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Expressionsplasmid pAD19B-IFN eingesetzt wird.

10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 7, 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß als Zellen multizellulärer Organismen CHO-Zellen verwendet werden.

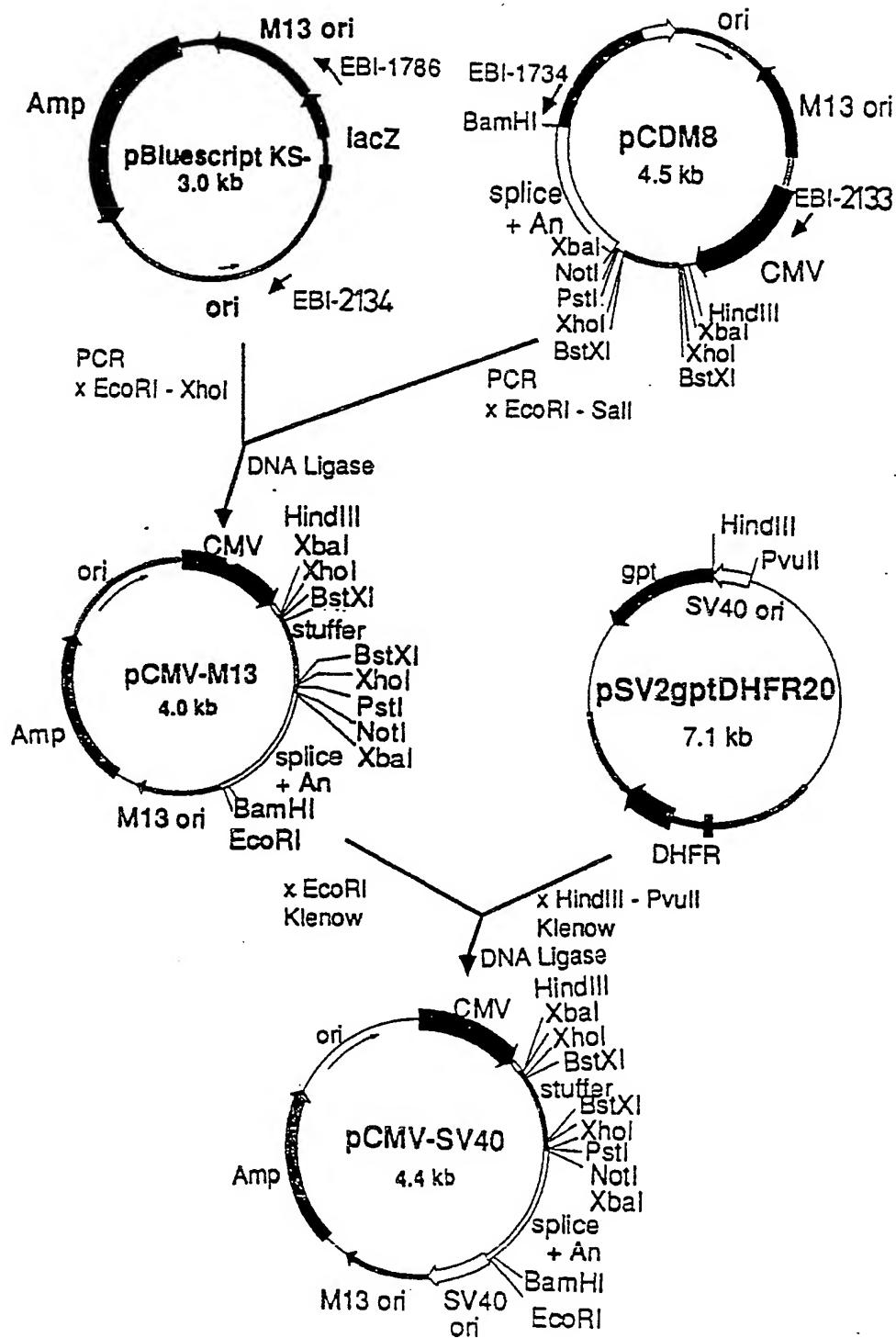
11. Expressionsplasmid zur Transfektion multizellulärer Organismen, dadurch gekennzeichnet, daß es pAD-CMV13, pAD-CMV15 oder pAD-CMV19 ist.

12. O-glycosyierte Interferon alpha, herstellbar nach einem der Ansprüche 4 bis 10.

13. Interferon alpha gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 12 zur Verwendung als Arzneimittel.

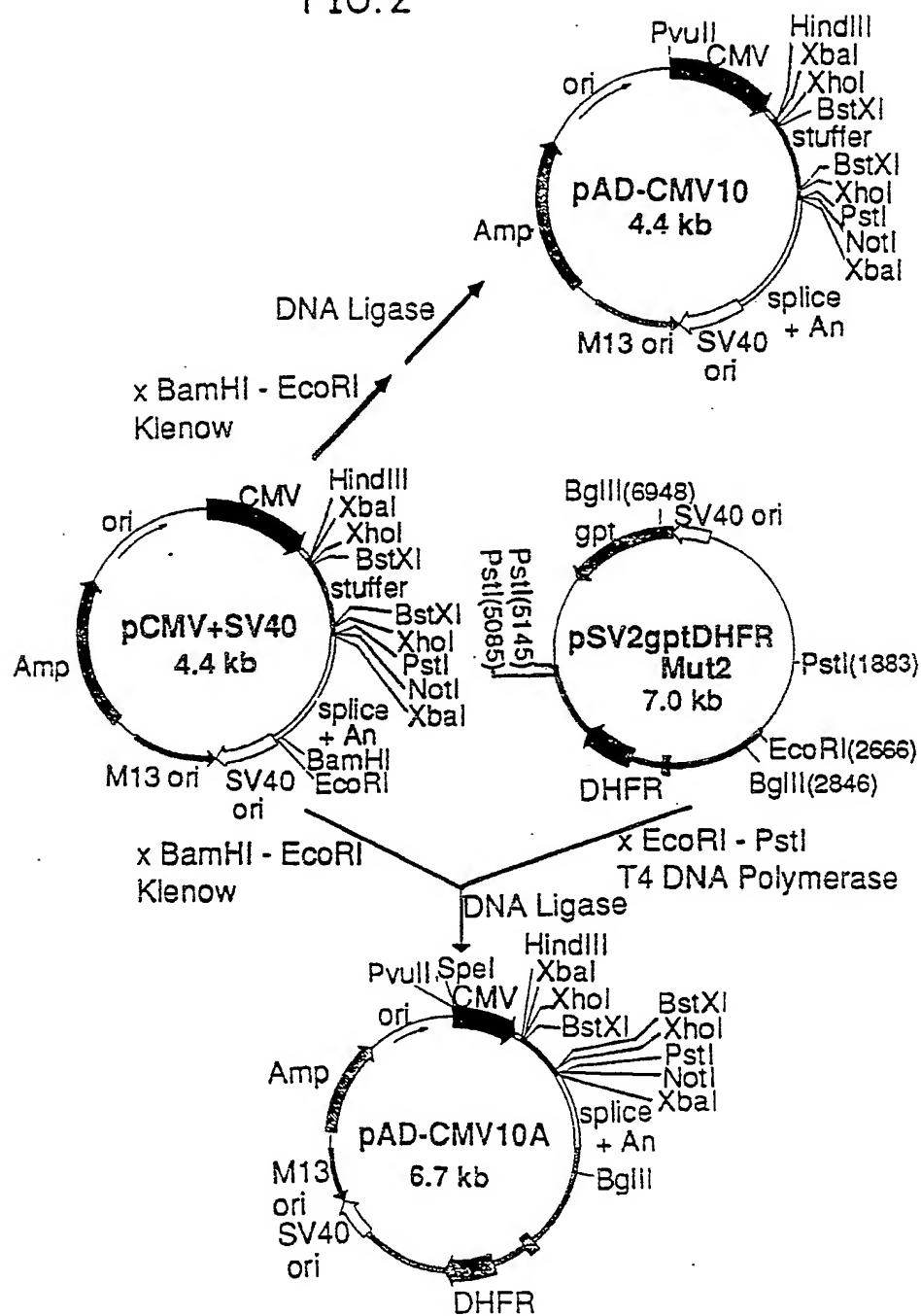
14. Mittel zur Behandlung viraler oder tumoraler Erkrankungen, ein Interferon alpha gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 12 enthaltend.
15. Mittel gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es aus einer Mischung aus mindestens zwei der O-glycosylierten Proteine IFN- $\alpha$ 2a, IFN- $\alpha$ 2b oder IFN- $\alpha$ 2c besteht.

FIG.1



2/32

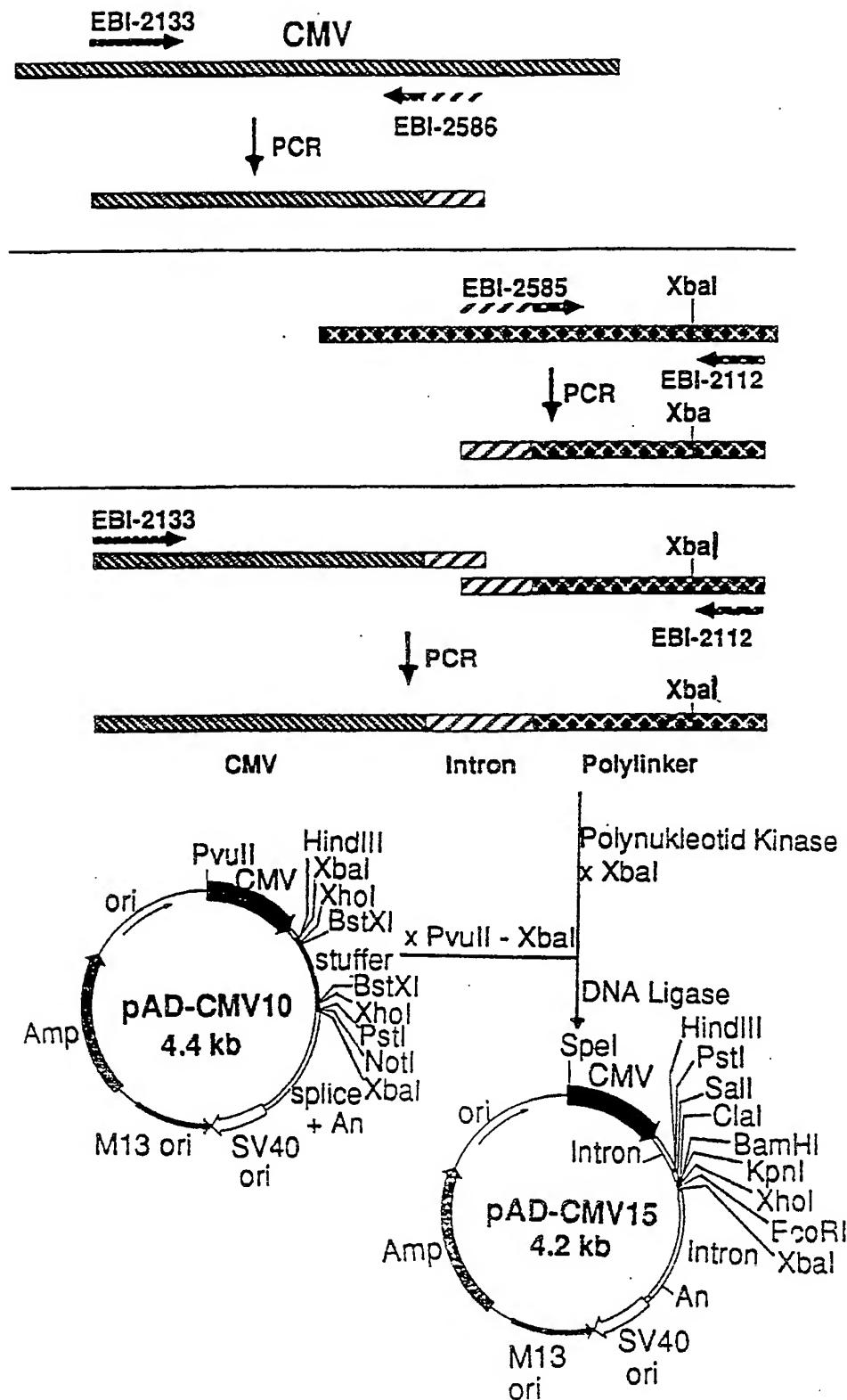
FIG.2



ERSATZBLATT

3/32

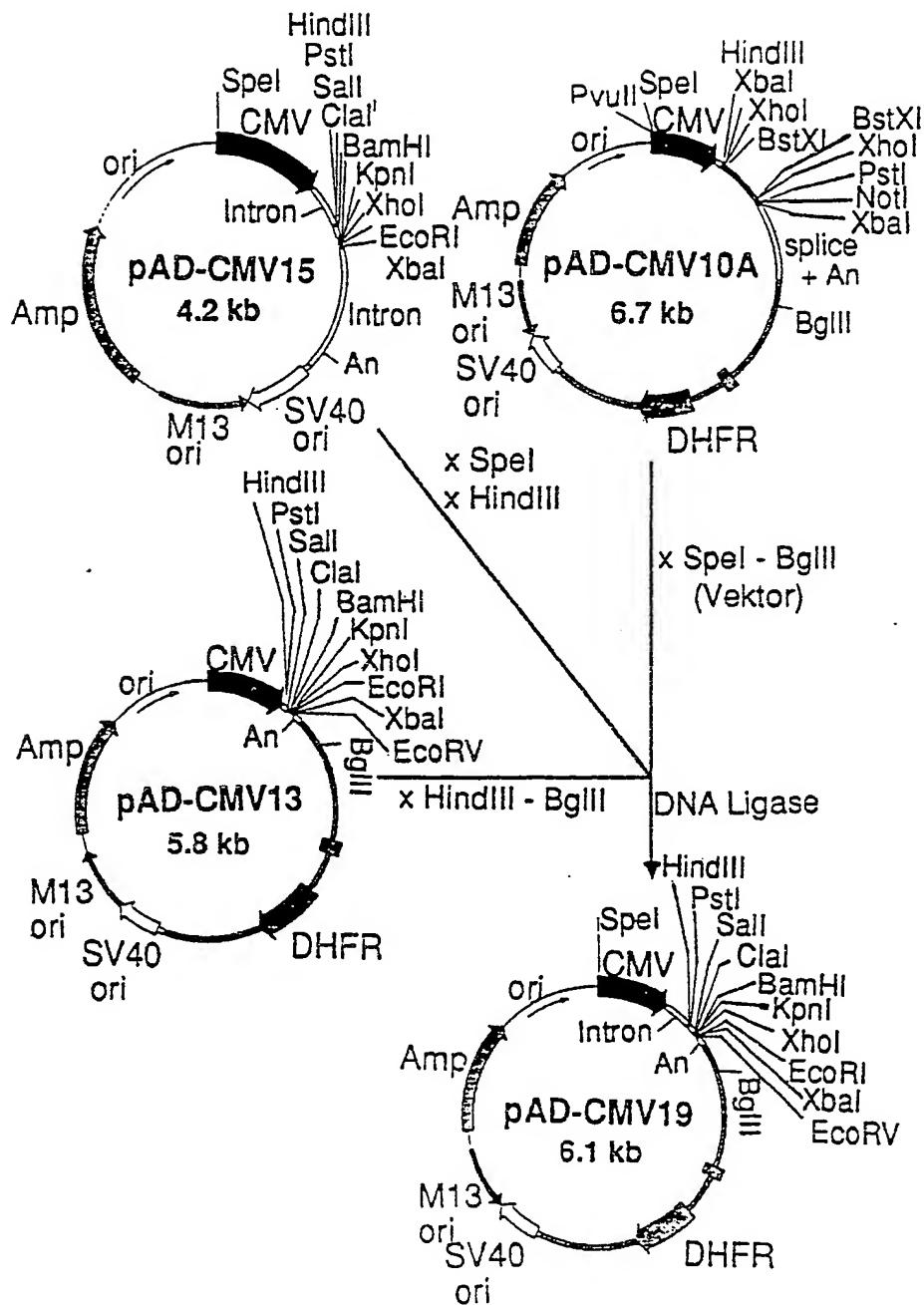
FIG. 3



ERSATZBLATT

4/32

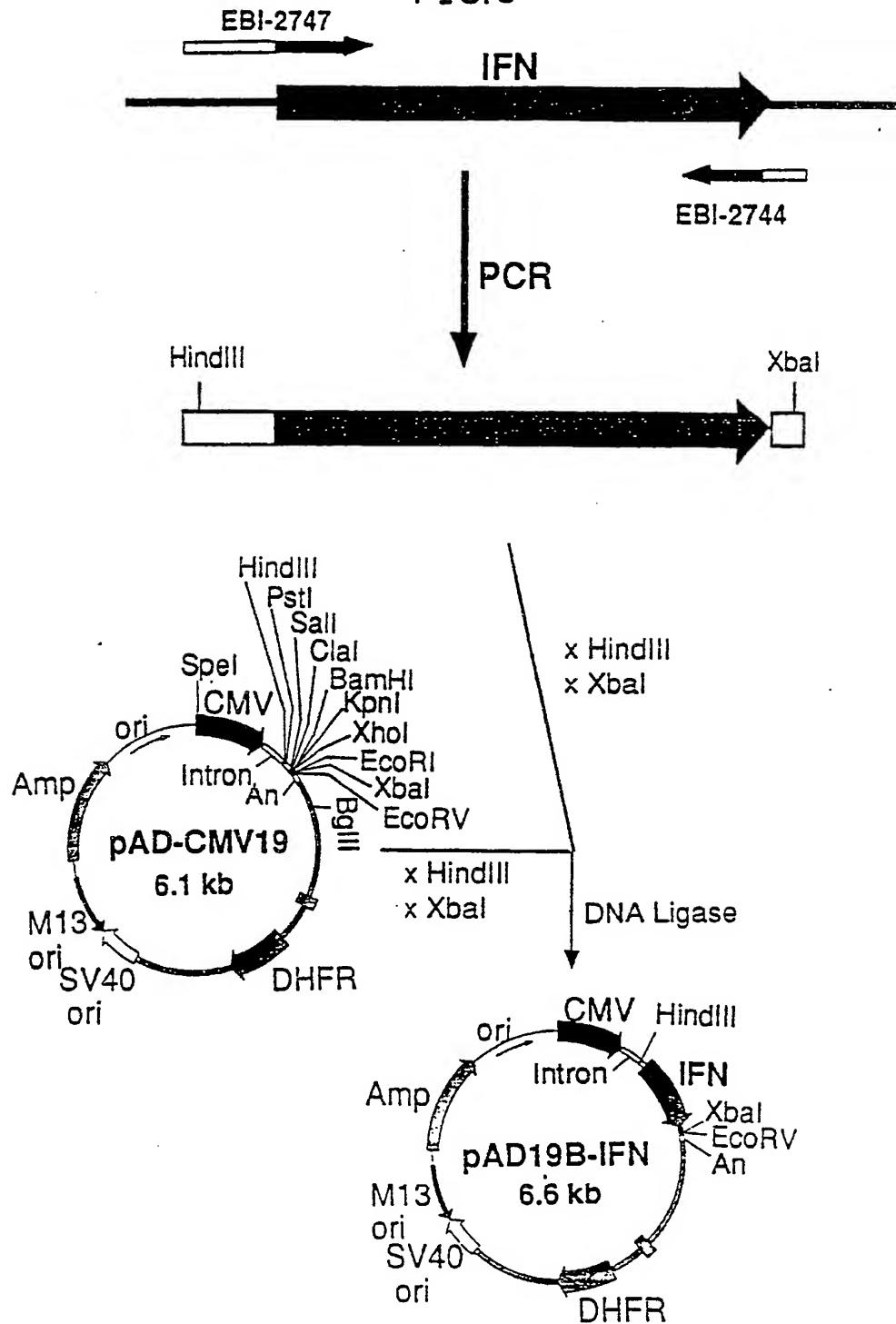
FIG. 4



ERSATZBLATT

5/32

FIG. 5



## ERSATZBLATT

6/32

## FIG.6A

HindIII/XbaI - Insert von pAD19B-IFN

AAGCTTAC ATT TGC TTC TGA CAC AAC TGT GTT CAC TAG CAA CCT CAA ACA				
9	18	27	36	45
-23				
GAC ACC ATG GCC TGT ACC TTT GCT TTA TTG GTG GCC CTC CTC	63	72	81	90
Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Val Ala Leu Val Ser Cys				
AAG TCA AGC TGC TCT GTG GGC TGT GAT	108	117	126	135
-1 1				
Lys Ser Ser Cys Ser Val Val Gly Cys ASP Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser				
AAG ACC TCC CTC CTC CTC GCA CAG ATG AGG AGA ATC TCT CTT TCC TGC	162	171	180	189
Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys				
AGG ACC TTG ATG ATG CTC CTC GCA CAG ATG AGG AGA ATC TCT CTT TCC TGC	162	171	180	189
-1 1				
Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys				
AGG ACC TTG ATG ATG CTC CTC GCA CAG ATG AGG AGA ATC TCT CTT TCC TGC	162	171	180	189
Leu Lys ASP Arg Arg Asp Phe GLY Phe Pro Gln Glu Glu Phe GLY Asn Gln Phe				
TTG AAG GAC AGA CGT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG TTT GGC AAC CAG TTC	216	225	234	243
Leu Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn				
CAA AAG GCT GAA ACC ATC CCT GTC CTC CAT GAG ATG ATC CAG CAG ATC TTC AAT	270	279	288	297
Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn				
CAC AAG GCT GAA ACC ATC CCT GTC CTC CAT GAG ATG ATC CAG CAG ATC TTC AAT	315			
Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys				
CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA TCT GCT GCT TGG GAT GAG ACC CTC CTC CTA GAC AAA	324	333	342	351
360 369				

ERSATZBLATT

7/32

FIG. 6B

Phe	Tyr	Thr	Glu	Leu	Tyr	Gln	Gln	Leu	Asn	Asp	Leu	Glu	Ala	Cys	Val	Ile	Gln
TTC	TAC	ACT	GAA	CTC	TAC	CAG	CAG	CTG	AAT	GAC	CTG	GAA	GCC	TGT	GTC	ATA	CAG
378	387					396			405					414			423
Gly	Val	Gly	Val	Thr	Glu	Thr	Pro	Leu	Met	Lys	Glu	Asp	Ser	Ile	Leu	Ala	Val
GGG	GTG	GGG	GTG	ACA	GAG	ACT	CCC	CTG	ATG	AAG	GAG	GAC	TCC	ATT	CTG	GCT	GTG
432	441					450			459					468			477
Arg	Lys	Tyr	Phe	Gln	Arg	Ile	Thr	Leu	Tyr	Leu	Lys	Glu	Lys	Tyr	Ser	Pro	
AGG	AAA	TAC	TTC	CAA	AGA	ATC	ACT	CTC	TAT	CTG	AAA	GAG	AAG	AAA	TAC	AGC	CCT
486	495					504				513				522			531
Cys	Ala	Trp	Glu	Val	Val	Arg	Ala	Glu	Ile	Met	Arg	Ser	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr
TGT	GCC	TGG	GAG	GTC	GTC	AGA	GCA	GAA	ATC	ATG	AGA	TCT	TTT	TCT	TTG	TCA	ACA
540	549					558				567				576			585
Asn	Leu	Gln	Glu	Ser	Leu	Arg	Ser	Lys	Glu	TER							
AAC	TTC	CAA	GAA	AGT	TTA	AGA	AGT	AAG	GAA	TGA	AAACTGGTTCTCTAGA						
594	603					612				621				630			639

ERSATZBLATT

8/32

FIG. 7A

pAD-CMV19

TCGACATTGA	TTATTGACTA	GTATTAAATA	GTAATCAATT	ACGGGGTCAAT	TAGTTCATAG	60
CCCATATATG	GAGTTCCGGCG	TTACATAACT	TACGGTAAAT	GGCCCCGCTG	GCTGACCGCC	120
CAACGACCCC	CGCCCATATGA	CGTCAATAAT	GACGTATGTT	CCCATAGTAA	CGCCAATAGG	180
GACTTTCCAT	TGACGTCAAT	GGGTGGAGTA	TTAACGGTAA	ACTGCCACT	TGGCAGTACA	240
TCAAGTGTAT	CATATGCCAA	GTACGCCCA	TATTGAGTC	ATGACGGTA	ATGGCCCCG	300
CTGGCATTAT	GCCCAGTACA	TGACCTATG	GAACCTTCCT	ACTTGGCAGT	ACATCTACGT	360
ATTAGTCATC	GCTATTACCA	TGGTGTATGCC	GTTCGGCAG	TACATCAATG	GGCGTGGATA	420
GGGGTTTGAC	TCACGGGGAT	TTCCAAGTCT	CCACCCCAT	GACGTCAATG	GGAGTTTGT	480
TTGGCACCAA	AATCAACGGG	ACTTTCAAA	ATGTCGTAAAC	AACTCCGCC	CATGACGCC	540
AATGGGGGGT	AGGGGTGTAC	GGTGGGAGGT	CTATATAAGC	AGAGCTCGTT	TAGTGAACCG	600
TCAGATGCC	TGGAGACGCC	ATCCACGCTG	TITTGACCTC	CATAGAAGAC	ACCGGGACCG	660
ATCCAGCCTC	CGGGGGGG	AACGGTGCAT	TGGAACGGGG	ATCCCCGTG	CCAAAGAGTCA	720
GGTAAGTACC	GCCTATAGAG	AGGACTCTTG	GGTTTCTGAT	AGGCACTGAC	TCTCTCTGCC	780
TATTGGCTTA	TTTCCCACC	CTTAGGCTGC	TGGTGCTTAA	CTGGCTTATC	GAATAATA	840
CGACTCACTA	TAGGGAGACC	CAAGCTCTG	CAGGTCGACA	TGATGGATC	CGGTACCTCG	900
AGCGGGAATT	CTCTAGAGAT	ATCTTGTATA	TTGCAAGCTTA	TAATGGTTAC	AAATAAGCA	960
ATAGCATCAC	AAATTTCACA	AATAAGCAT	TTTTTTCACT	GCATTCTAGT	TGTGGTTTGT	1020
CCAAACTCAT	CAATGTATCT	TATCATGTCT	GGATCAATTTC	TGAAAAAACTA	GCCTTAAAGA	1080
CAGACAGCTT	TGTTCTAGTC	AGCCAGGCAA	GCATATGTTAA	ATAAAGTTC	TCAGGGAAACT	1140
GAGGTTAAA	GATGTATCCT	GGACCTGCCA	GAACCTGGCCA	TTCACGTAAA	CAGAAGATT	1200
CGCCCTCAAGT	TCCGGTTAAC	AACAGGAGGC	AACGAGATCT	CAAATCTATT	ACTTCTAATC	1260
GGGTAAATTAA	AACCTTTCAA	CTAAAACACG	GAACCCACGGA	TGTCACCCAC	TTTCCCTTCC	1320
CGGGCTCCGG	CCTTCTCAGT	ACTCCCCACC	ATTAGGCTCG	CTACTCCACC	TCCACTTCCG	1380
GGCGCGACAC	CCACGGACAC	TCTCCCAACCC	GACGCTAACCC	CGGCCCTGCG	CCGTCTGACC	1440

9/32

FIG.7B

CCGCCACCA	CCTGGCCCC	CCCCGTGTAG	GACAGAAAGAA	ACCCCGGGCA	GCCGGCAGCCA	1500
AGGCCGACGG	GTAGACGGCTG	GGGGCGCTGA	GGAGTCTGCC	TCTACCTTCT	CTGCTGGCTC	1560
GGTGGGGAC	GGGGTGGATC	TCAGGCTTCC	GGAAAGACTGG	AAGAACCGGC	TCAGAACCGC	1620
TTGTCTCCG	GGGGCTTGGG	CGGCGGAAGA	ATGGCCGCTA	GACGGGGACT	TGGTGCAGGG	1680
CATCGCAGGA	TGCAGGAAGAG	CAAGCCGCC	GGAGGCCGC	GCCTGTACTA	CCCCGGGCCT	1740
GGAGGGCCA	CGCCGCACTG	GGCGGGCCG	GCCTGGTGGA	GGCGGAGTCT	GACCTCGTGG	1800
AGGGGGCC	TCTGATGTTG	AAATAGGATG	CTAGGCTLTGT	TGAGGGCTGG	CCTCCGATTC	1860
ACAAGTGGGA	AGCAGGCCG	GGCGACTGCA	ATTTCGGCC	AAACTTGGG	GAAGCACAGC	1920
GTACAGGCTG	CCTAGGTGAT	CGCTGCTGCT	GTCATGGTTC	GACCGCTGAA	CTGCATCGTC	1980
GCCGTGTCCC	AGAATATGGG	CATCGGCAAG	ACGGGACACC	TTCCCTGGCC	AATGGCTCAGG	2040
TACTGGCTGG	ATTGGGTTAG	GGAAACCGAG	GGGGTTCCGCT	GAATCGGGTC	GAGCACTTGG	2100
CGGAGACGGG	CGGGCCAAC	ACTTAGGGAC	AGTCATGAGG	GGTAGGGCCG	CCGGCTGGCTG	2160
CCCTTGGCCA	TGCCCGGGT	GATCCCCATG	CTGTGCCAGC	CTTGGCCAG	AGGGGCTCTA	2220
GCTGGGAGCA	AAGTCGGTC	ACTGGGCAGC	ACCACCCCCC	GGACTTGCAT	GGTAGGCCG	2280
TGAGATGGAG	CCTGAGGACA	CGTGACAGGG	TCCCTGTAA	CGCAGTGTCTT	CTCTAACTTT	2340
CAGGAACGAG	TTCAAGTACT	TCCAAGAAAT	GACCACCAAC	TCCTCAGTGG	AAGGTAANACA	2400
GAACCTGGTG	ATTATGGCC	GGAAAACCTG	GTTCCTCCATT	CC TGAGAAGA	ATCGACCTTT	2460
AAAGGACAGA	ATTAATATAG	TTCTCAGTAG	AGAGCTCAAG	GAACCCAC	AAGGAGCTCA	2520
TTTCTTGGCC	AAAAGTCTGG	ACCATGCCCT	AAAACCTATT	GAACAACCAG	AGTTAGCAGA	2580
TAAAGTGGAC	ATGGTTGGAA	TAGTTGGAGG	CAGTTCCCGTT	TACAAGGAAG	CCATGAATCA	2640
GCCAGGCCAT	CTCAGACTCT	TTGTGACAAG	GATCATGCAG	GAATTGAAA	GTGACACGTT	2700
CTTCCCGAGAA	ATTGATTGG	AGAAATATAA	ACTTCTCCCA	GAGTACCCAG	GGTCCTTTC	2760
TGAAGTCCAG	GAGGAAAG	GCATCAAGTA	TAAATTGAA	GTCTATGAGA	AGAAAGGCTA	2820
ACAGAAAGAT	ACTTGGCTGAT	TGACTTCAAG	TTCTACTGCT	TTCTCTCTAA	AATTATGCTAT	2880
TTTACAAGA	CCATGGGACT	TGTGTTGGCT	TTAGATCCTG	TGCATCCTGG	GCAACTGTG	2940
TACTCTAAGC	CACTCCCCAA	AGTCATGCC	CAGCCCCCTGT	ATAATTCTAA	ACAAATTAGAA	3000

10/32

FIG.7C

TTATTTCAT	TTTCATTAGT	CTAACCAAGGT	TATATTAAAT	ATACTTTAAG	AAACACCATT	3060
TGCCATAAAG	TTCTCAATGC	CCCTCCCATG	CAGCCTCAAG	TGGCTCCCCA	GCAGATGGCAT	3120
AGGGTAGTGT	GTGTACAAGA	GACCCAAAG	ACATAGAGCC	CCTGAGAGCA	TGAGCTGATA	3180
TGGGGCTCA	TAGAGATAGG	AGCTAGATGA	ATAAGTACAA	AGGGCAGAAA	TGGGTTTAA	3240
CCAGCAGAGC	TAGAACTCAG	ACTTTAAAGA	AAATTAGATC	AAAGTAGAGA	CTGAATTATT	3300
CTGCAACATCA	GACTCTGAGC	AGAGTTCTGT	TCACTCAGAC	AGAAAATGGG	TAATTGAGA	3360
GCTGGCTCCA	TTGGTGTCTCT	TAGAGATGGG	AGCAGGTGGA	GGATTATATA	AGGTCTGGAA	3420
CATTAACTT	CTCCGGTTCT	CATCTTCAGT	GAGATTCCAA	GGGATACTAC	AATTCTGTGG	3480
AATGTTGTTC	AGTTAGGGTG	TGAAAGTCC	CCAGGCTCCC	CAGCAGGCAG	AACTATGCAA	3540
AGCATGCATC	TCAATTAGTC	AGCAACCAAGG	TGTGGAAAGT	CCCCAGGGCTC	CCCAGCAGGC	3600
AGAAGTATGC	AAAGCATGCA	TCTCAATTAG	TCAGCAACCA	TAGTCCCCGC	CCTAACTCTCG	3660
CCCATCCCGC	CCCTAACTCC	GCCCCAGTCC	GCCCCATTCTC	CGCCCCATGG	CTGACTAATT	3720
TTTTTTATT	ATGGCAGAGG	CGAGGGCCCT	CTGAGCTATT	CCAGAACTAG	TGAGGAGGCT	3780
TTTTGGAGG	CCTAGGGCTT	TGCAAAAG	CTAATTCAAG	CTGAATGGCG	AATGGGAAT	3840
TGTAAACGTT	AAATTTTGT	TTAAATTCG	TTAAATTTT	TGTTAAATCA	GCITCATTTT	3900
TAACCAATAG	GCCGAAATCG	GCAAAATCCC	TTATAAATCA	AAAGAAATAGA	CCGAGATAGG	3960
GTTGAGTGT	GTTCAGTGT	GGAACAAAGAG	TCCACTATTA	AGAAACGTGG	ACTCCAACGT	4020
CAAAGGGGA	AAAACCGTCT	ATCAGGGCGA	TGGCCCCACTA	CGTGAACCAT	CACCCCTAATC	4080
AAGTTTTGG	GGTGGAGGTG	CGTAAAGCA	CTAAATCGGA	ACCCCTAAAGG	GAGCCCCCGA	4140
TTTAGAGCTT	GACGGGGAAA	GCCGGCGAAC	GTGGCGAGAA	AGGAAGGGAA	GAAAGGGAA	4200
GGAGGGGGC	CTAGGGGGCT	GGCAAGTGT	GGGGTCACGC	TGGCGGTAAAC	CACCAACCCC	4260
GCCGGCCTA	ATGGCCCGCT	ACAGGGCGC	TCAGGTGGCA	CTTTTCGGGG	AAATGTGGGC	4320
GGAAACCCCTA	TTTGTGTTATT	TTTCTAAATA	CATTCAAAATA	TGTATCCGCT	CATGAGACAA	4380
TAACCCCTGAT	AAATGCTTCA	ATAATATTGA	AAAAGGAAAGA	GTATGAGTAT	TCAACATTTTC	4440
CGTGTGGCCC	TTATTCCCTT	TTTTGGGCA	TTTTGGCTTC	CTGTTTTGTC	TCACCCAGAA	4500
ACGCTGGTGA	AAAGTAAAGA	TGCTGAAGAT	CAGTTGGGTG	CACGAGTGGG	TTACATCGAA	4560

11/32

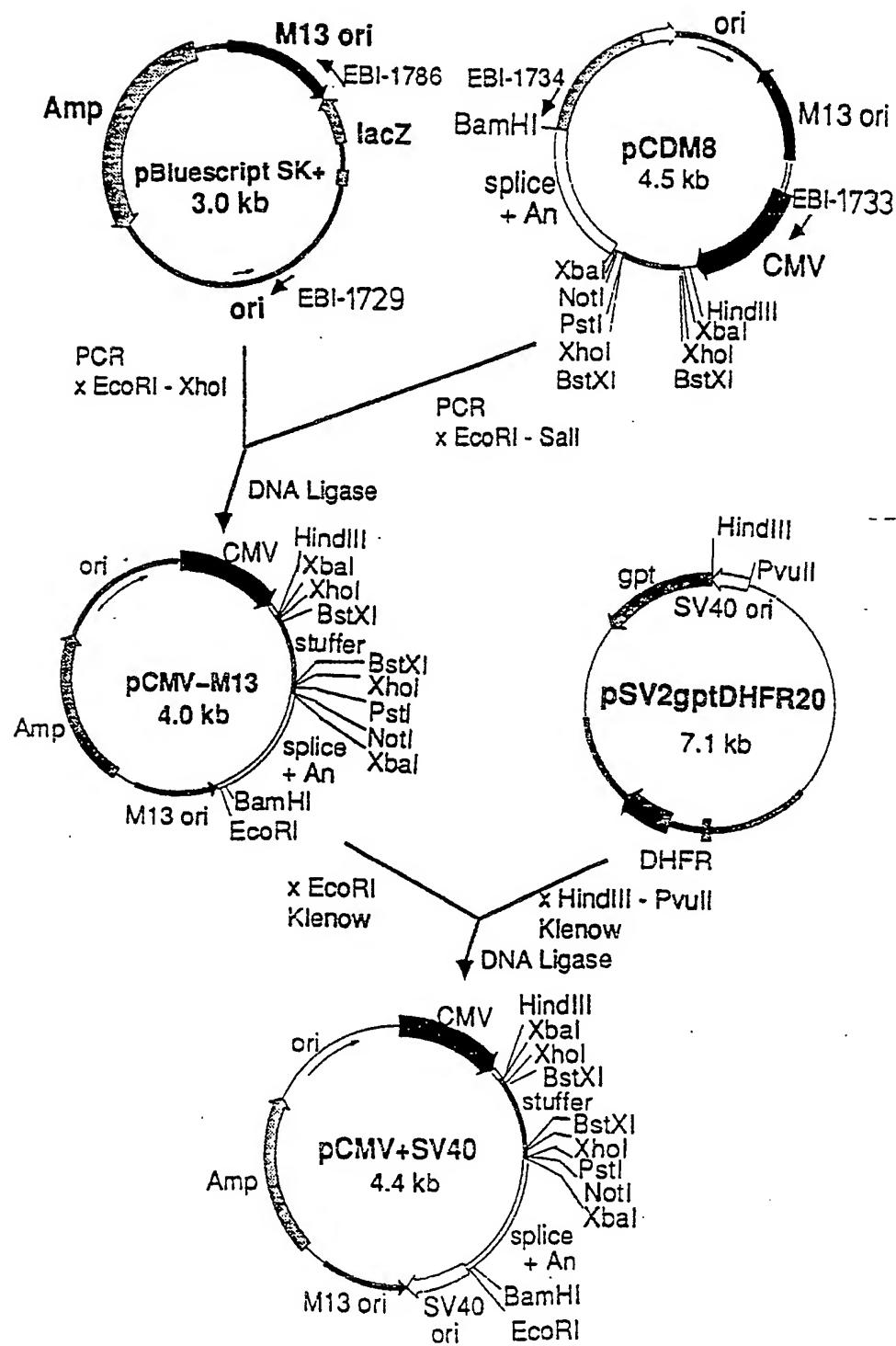
FIG.7D

CTGGATCTCA	ACAGGGTAA	GATCCTTGAG	AGTTTCTGAG	CCGAAGAACG	TTTTCCAATG	4620
ATGAGGCACTT	TTAAAGTTCT	GCTATGTGGC	GGGGTATTAT	CCCGTATTGA	CGCCGGGCAA	4680
GAGGCACTCG	GTCGCCGCAT	ACACTATTCT	CAGAATGACT	TGGTTGAGTA	CTCACCAAGTC	4740
ACAGAAAAGC	ATCTTACGGA	TGGCATGACA	GTAAAGAGAAT	TATGCAGTGC	TGCCATAACC	4800
ATGAGTGTATA	ACACTGGGC	CAACTTACTT	CTGACAAACGA	TCGGAGGACC	GAAGGAGCTA	4860
ACCGCTTTT	TGCACAAACAT	GGGGATCAT	GTAAACTCGCC	TTGATCGTTG	GGAAACCCGGAG	4920
CTGAAATGAA	CCATACCAA	CGACGGCGT	GACACCACGA	TGCCTGTAGC	ATGGCAACA	4980
ACGTTGGCCA	AACTTAAAC	TGGCGAACTA	CTTAACCTAG	CTTCCCGGCA	ACAATTAAATA	5040
GACTGGATGG	AGGGGATAA	AGTTGCAGGA	CCACTTCTGC	GCTCGGCCCT	TCCGGCTGGC	5100
TGGTTTATTG	CTGATAAATC	TGGAGCCGGT	GAGCGTGGGT	CTCGCGGTAT	CATTGAGCAGCA	5160
CTGGGCCAG	ATGGTAAGCC	CTCCCCGTATC	GTAGTTATCT	ACACGACGGG	GAGTCAGGCCA	5220
ACTATGGATG	AACGAAATAG	ACAGATCGCT	GAGATAGGTG	CCTCACTGAT	TAAGCATGG	5280
TAACTGTCA	ACCAAGTTA	CTCATATATA	CTTGTAGATTG	ATTAAACT	TCATTTTAA	5340
TTTAAAGGA	TCTAGGTGAA	GATCCTTTT	GATAATCTCA	TGACCAAAT	CCCTTAACGT	5400
GAGTTTTCTG	TCCACTGAGC	GTCAAGCCCC	GTAGAAANAGA	TCAAAGGATC	TTCTTGAGAT	5460
CCTTTTTTC	TGCGCGTAAT	CTGCTGCTTG	CAAACAAAAA	AACCACCGCT	ACCAGGGGTG	5520
GTTTGTTCG	CGGATCAAGA	GCTACCAACT	CTTTTCCGA	AGGTAACCTGG	CTTCAGCAGA	5580
GCGCAAGATAC	CAAATACTGT	CCTTCTAGTG	TAGCCGTAGT	TAGGCCACCA	CTTCAGAAC	5640
TCTGTAGCAC	CGCCCTACATA	CCTCGCTCTG	CTAATCCCTGT	TACCACTGGC	TGCTGCCAGT	5700
GGCGATAAGT	CGTGTCTAC	CGGGTTGGAC	TCAAGACGAT	AGTTACCGGA	TAAGGGCAG	5760
CGGTGGGCT	GAACGGGGG	TTCGTGCACA	CAGCCCAGCT	TGGAGCGAAC	GACCTACACC	5820
GAACGTGAGAT	ACCTACAGCG	TGAGCATATGA	GAAAGGCCA	CGCTTCCCGA	AGGGAGAAAG	5880
GCGGACAGGT	ATCCGGTAAG	CGGGCAGGGTC	GGAAACAGGAG	AGGCGACGGAG	GGAGGCTTCACA	5940
GGGGAAAACG	CCTGGTATCT	TTATAGTCCT	GTGGGGTTTC	GCCACCTCTG	ACTTGAGGCT	6000
CGATTTTGT	GATGCTCGTC	AGGGGGCGG	AGCCTATGGA	AAAACGCCAG	CAACGCCAGCT	6060
			GC			

ERSATZBLATT

12/32

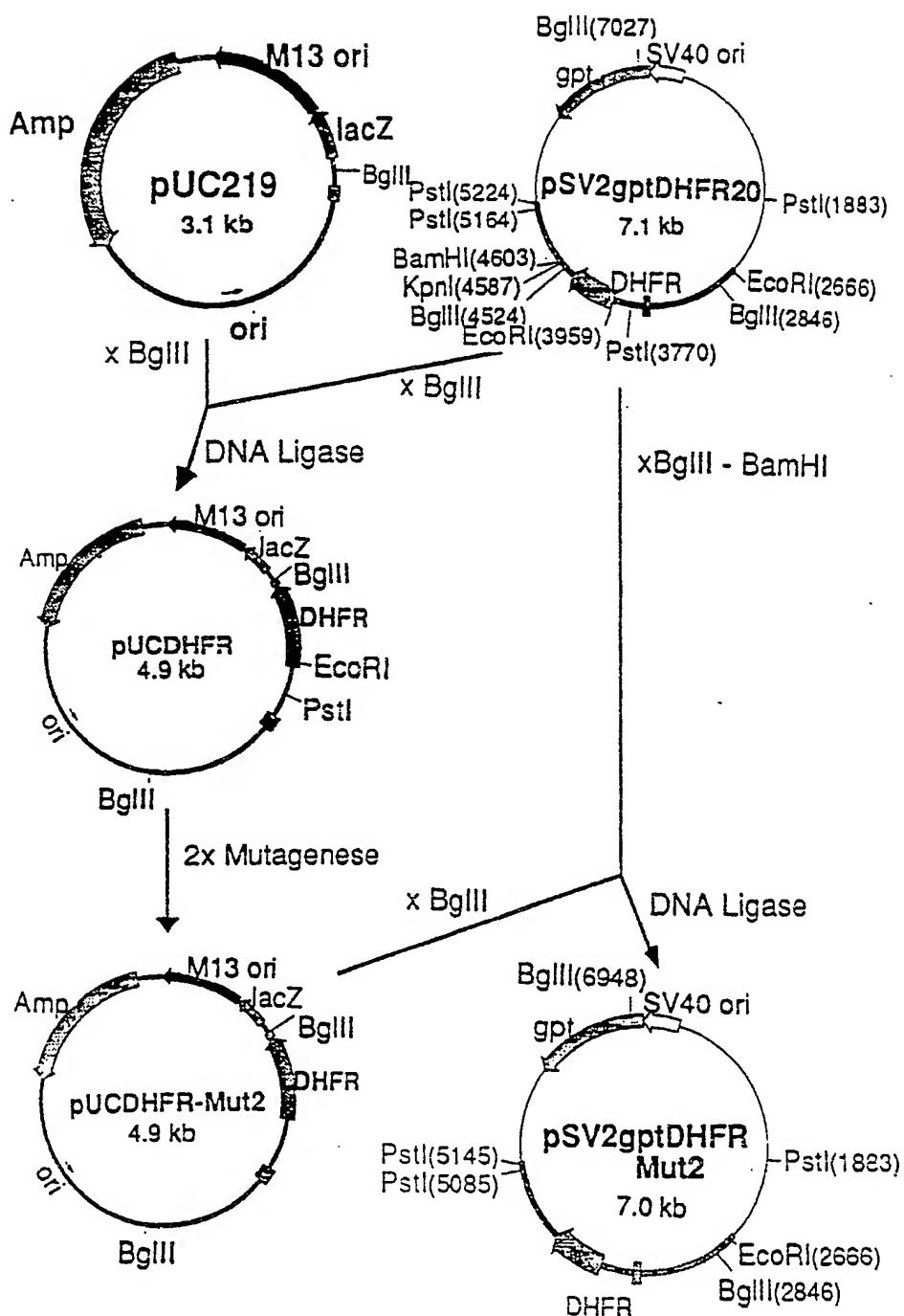
FIG. 8



ERSATZBLATT

13/32

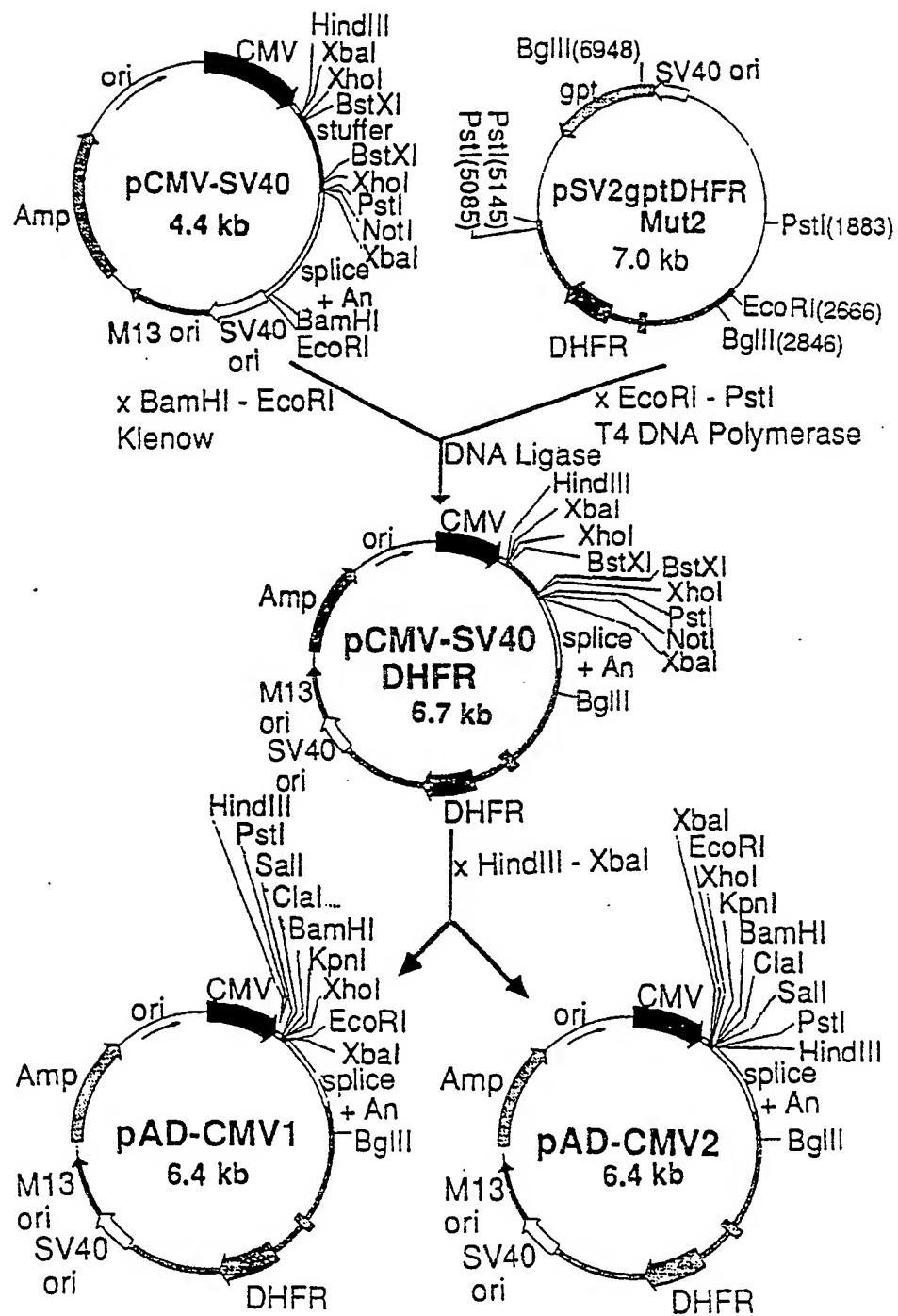
FIG.9



ERSATZBLATT

14/32

FIG.10



ERSATZBLATT

15/32

FIG.11A

pAD-cmv1 : 6414 bp

TCGACATTGA	TTATTGACTA	GTTATTAAATA	GTAATCAATT	ACGGGGTCAT	TAGTTCATAG	60
CCCATATATG	GAGTTCCGCG	TTACATTAAC	TACGGTAAT	GGCCCCCTG	GCTGACCGCC	120
CAACGACCCC	CGCCCATATG	CGTCAATAAT	GACGTTATGTT	CCCATAGTAA	CGCCAATAAGG	180
GACTTCCAT	TGACGTCAAT	GGGTGGAGTA	TTTACGGTAA	ACTGCCCACT	TGGCAGTACA	240
TCAAGTGTAT	CATATGCCAA	GTACGCCCA	TATTGACGTC	AATGACGGTA	AATGGCCCGC	300
CTGGCATTAT	GCCCAGTACA	TGACCTTATG	GGACTTTCCCT	ACTTGGCAGT	ACATCTACGT	360
ATTAGTCATC	GCTATTACCA	TGGTGTGCG	GTTTTGGCAG	TACATCAATG	GGCGTGGATA	420
CGGGTTGAC	TCACGGGAT	TTCCAAGTCT	CCACCCCAATT	GACGTCAATG	GGAGTTTTGT	480
TTGGCACCAA	AATCAACGGG	ACTTTCCAAA	ATGTCGTAAAC	AATCTCCGCC	CATTGACGCA	540
AATGGGGGT	AGGGGTGTAC	GGTGGGAGGT	CTATATAAGC	AGAGCTCTCT	GGCTAACTAG	600
AGAACCCACT	GCTTAACTGG	CTTATCGAAA	TTAATACGAC	TCACTATAGG	GAGACCCAAAG	660
CTTCTGCAGG	TCGACATCGA	TGGATCCGGT	ACCTCGAGGCG	CGAATTCTCT	AGAGGATCTT	720
TGTGAAGGAA	CCTTACTTCT	GTGGGTGTGAC	ATAATTGGAC	AAACTACCTA	CAGAGATTAA	780
AAGCTCTAAG	GTAATATAA	AATTTTTAAG	TGTATATGTT	GTAAACTAC	TGATTCTAT	840
TGTTGATTTC	TTTAGATT	CAACCTATGG	AACGTATGAA	TGGGAGCAGT	GGTGGAAATGC	900
CTTIAATGAG	GAACCTGT	TTTGCTCAGA	AGAAATGCCA	TCTAGTGTATG	ATGAGGCTAC	960
TGCTGACTCT	CAACATTCTA	CTCCCTCCAAA	AAAGAAGAGA	AAGGTAGAAG	ACCCCAAGGA	1020
CTTCCCTTCA	GAATTGCTAA	GTTTTTGAG	TCATGCTGTG	TTAGTATAA	GAACCTTGC	1080
TTGCTTTGCT	ATTACACCA	CAAAGGAAAAA	AGCTGCACGT	CTATACAGA	AAATTATGGA	1140
AAAATATTG	ATGTATAGTG	CCTTGACTAG	AGATCATATAAT	CAGCCATACC	ACATTGTAG	1200
AGGTTTTACT	TGCTTTAAA	AAACCTCCAC	ACCTCCCCCT	GAACCTGMAA	CATAAAATGA	1260
ATGCAATTG	TGTTGTTAAC	TGTTTATTG	CAGCTTATAAA	TGGTTACAAA	TAAGGAATA	1320
GCATCACAAA	TTTCACAAAT	AAAGCATT	TTTCACIGCA	TCTTAGTTGT	GGTTTGTCCA	1380
AACTCATCAA	TGTATCTTAT	CATGTCGG	TCAATTCTGA	GAAGACTAGCC	TTAAAGACAG	1440
ACAGCTTTGT	TCTAGTCAGC	CAGGCAAGCA	TATGTAATAA	AAGTTCCCTCA	GGGAACCTGAG	1500

16/32

FIG.11B

GTAAAGAT	GTATCCTGGA	CCTGCCAGAC	CTGGCCATT	ACGTAACAG	AAGATTCCGC	1560
CTCAAGTTCC	GGTTAACAAAC	AGGAGGCAAC	GAGATCTCAA	ATCTTAACT	TCTAATCGGG	1620
TAATTAACAC	CTTTCAACTA	AAACACGGAC	CCACGGATGT	CACCCACTT	TCCTTCCCCG	1680
GCTCCGCCCT	TCTCAGTACT	CCCCACCCATT	AGGCTCGCTA	CTCCACCTCC	ACTTCCGGGC	1740
GGGACACCCA	CGTGCCTCT	CCCACCCGAC	GCTAACCCCCG	CCCTGCCCCG	TCTGACCCCG	1800
CCCACCCACCT	GGCCCCGCC	CGTTGAGGAC	AGAAGAAACC	CCGGCAGCC	GCAGCCAAGG	1860
CGGACGGGTA	GACGGCTGGGG	GGGCTGAGGA	GTGCTCCCT	ACCTTCTCTG	CTGGCTCGGT	1920
GGGGGACGGG	GTGGATCTCA	GGCTTCGGGA	AGACTGGAAAG	ANCCGGCTCA	GAACCGCTTG	1980
TCTCCGGGG	GCTTGGGCG	CGGAAGAATG	GGCGCTAGAC	GGGGACTTGG	TGGGAGGGCAT	2040
CGCAGGGATGC	AGAAAGGCAA	CCCCGCCGGG	AGCCGCCGGG	TGTTACTACCC	CGGCCCTGGA	2100
GGGGGCCACGC	CGGACTGGGC	GGGGCCGGCC	TGGTGGAGGG	GGAGTCTGAC	CTCGTGGAGG	2160
CGGGGCCTCT	GATGTTCAA	TAGGATGCTA	GGCTTGTGTA	GGGTTGGCCT	CCGATTTCACA	2220
AGTGGGAAGC	AGCGCCGGGC	GACTGCAATT	TGGCGCCAAA	CTTGGGGGAA	GCACAGCGTA	2280
CAGGCTGCCT	AGGTGATCGC	TGCTGCTGTC	ATGGTTCGAC	CGCTGAACTG	CATCGTCGCC	2340
GTGCTCCAGA	ATATGGCAT	CGGCAAGAAC	GGAGACCTTC	CCTGGCCAAAT	GCTCAGGTAC	2400
TGGCTGGATT	GGGTTAGGGA	AACCGAGGGC	GTTCGCTGAA	TCGGGTCCAG	CACTTGGGG	2460
AGACGCCGGG	GCCAACTA	TAGGGACAGT	CATGAGGGGT	AGGGCCGGCG	GCTGCTGCC	2520
TGCCCCATG	CCGGGGTGT	CCCCATGCTG	TGCCAGCCTT	TGCCAGAGG	CGCTCTAGCT	2580
GGGAGCAAAG	TCCGGTCACT	GGGCAGCACC	ACCCCCCGGA	CTTGCATGGG	TAGCCGCTGA	2640
GATGAGGCCT	GAGCACACGT	GACAGGGTCC	CTGTTAACGC	AGTGTTCCTC	TAACTTTCTAG	2700
GAACGAGTTC	AAGTACTTCC	AAAGAAATGAC	CACCCACCTCC	TCAAGTGGAAAG	GTAACAGAA	2760
CCTGGTGTATT	ATGGGGCGGA	AAACCTGGTT	CTCCATTCTCT	GAGAAGAATC	GACCTTTAAA	2820
GGACAGAAATT	AATATAAGTTC	TCAAGTAGAGA	GCTCAAGGAA	CCACCAAGAG	GAGCTCATTT	2880
TCTTGCCTAA	AGTCTGGACC	ATGCCTTAAA	ACTTATGAA	CAACCAAGAT	TAGCAGATAAA	2940
AGTGGACATG	GTGGGGATAG	TTGGGGCAG	TTCCGTTTAC	AAGGAAGCCA	TGAATCAGGC	3000
AGGCCATCTC	AGACTCTTGT	TGACAAAGGAT	CATGCAGGAA	TTGAAAGTG	ACACGTTCTT	3060

17/32  
FIG. 11C

CCCAGAAATT	GATTTGGAGA	AATATAACT	TCTCCAGAG	TACCCAGGG	TCCTTTCTGA	3120
AGTCCAGGAG	GAAAAGGCA	TCAAGTATAA	ATTGGAAGTC	TATGAGAAGA	AGGGCTAACAA	3180
GAAAGATACT	TGCTGATTGA	CTTCAGGTC	TACTGGCTTC	CTCCTAAAT	TATGCATT	3240
TACAAAGACCA	TGGGACTTGT	GTGGGCCTTA	GATCCTGTGC	ATCCCTGGCA	ACTGTTGTAC	3300
TCTAAGCCAC	TCCCCAAAGT	CATGCCCGAG	CCCCTGTATA	ATTCCTAAACA	ATTAGAATTAA	3360
TTTTCAATT	CATTAGTCTA	ACCAGGTAT	ATTAAATATA	CTTAAAGAAA	CACCATTTGC	3420
CATAAAGTTC	TCAAATGCC	TCCCATTGCAG	CCTCAAGTGG	CTCCCCAGCA	GATGGCATAGG	3480
GTAGTGTGTG	TACAAGAGAC	CCCAAAAGACA	TAGAGCCCCCT	GAGAGCATGA	GCTGTATATGG	3540
GGGCTCATAG	AGATAGGAGC	TAGATGAATA	AGTACAAGG	GCAGAAATGG	GTTTAACCCA	3600
GCAGAGCTAG	AACTCAGACT	TTAAAGAAAA	T TAGATCAA	GTAGAGACTG	AATTATTCTG	3660
CACATCAGAC	TCTGAGCAGA	GTCTGTTCA	CTCAGACAGA	AAATGGGTA	ATTGAGAGCT	3720
GGCTCCATTG	TGCTCCTTAG	AGATGGGAGC	AGGTGGAGGA	TTATATAAGG	TCTGGAACAT	3780
TTAAACTTCTC	CGTTTCTCAT	CTTCAGGTGAG	ATTCCAAGGG	ATACTACAT	TCTGTGGAAT	3840
GTGTGTCACT	TAGGGTGTGG	AAAGTCCCCA	GGCTCCCGAG	CAGGCAGAG	TATGCAAAGC	3900
ATGCATCTCA	ATTAGTCAGC	AACCAGGTGT	GGAAAGTCCC	CAGGCTCCCC	AGCAGGCAGA	3960
AGTATGCAA	GCATGCATCT	CAATTAGTCA	GCAACCATAG	TCCC GCCCT	AACTCCGCC	4020
ATCCCGCCCC	TAACTCCGCC	CAGTTC CGCC	CATTCTCGC	CCCATGGCTG	ACTAATT	4080
TTTATTATG	CAGAGGCCGA	GGGCCCTCTG	AGCTATTCA	GAAGTAGTGA	GGAGGGTTT	4140
TTGGAGGCCT	AGGTTTTGC	AAAAAAGCTA	ATTCAAGCTG	AATGGCGAAT	GGGACGGGCC	4200
CTGTAGGGCC	GCATTAAGCC	CGGGGGTGT	G GTGGTTACG	CGCAGGCTGA	CCGCTACACT	4260
TGCCAGGCC	CTAGGCCCG	CTCCCTTCGC	TTTCTTCCCT	TCCTTTCTCG	CCACGTTCCG	4320
CGGCTTTCCC	CGTCAAGCTC	TAATCGGG	GCTCCCTTA	GGGTTCCGAT	TTAGTGCTT	4380
ACGGCACCTC	GACCCAAAAA	ACTTGATTAG	GGTGTATGGTT	CACGTAGTGG	GCCATCGCCC	4440
TGATAGACGG	TTTTTGCC	TTTGACGTTG	GAGTCCACGT	TCTTTAATAG	TGGACTCTTG	4500
TTCCAAACTS	GAACAAACAT	CAACCCATAC	TCGGTCTATT	CTTTTGATT	ATAAGGGATT	4560
TTGCCGATT	CGGCCTATTG	GTAAAAAAT	GAGCTGATT	ACCAAAATT	TAACCGCGAAT	4620

18/32

FIG. 11D

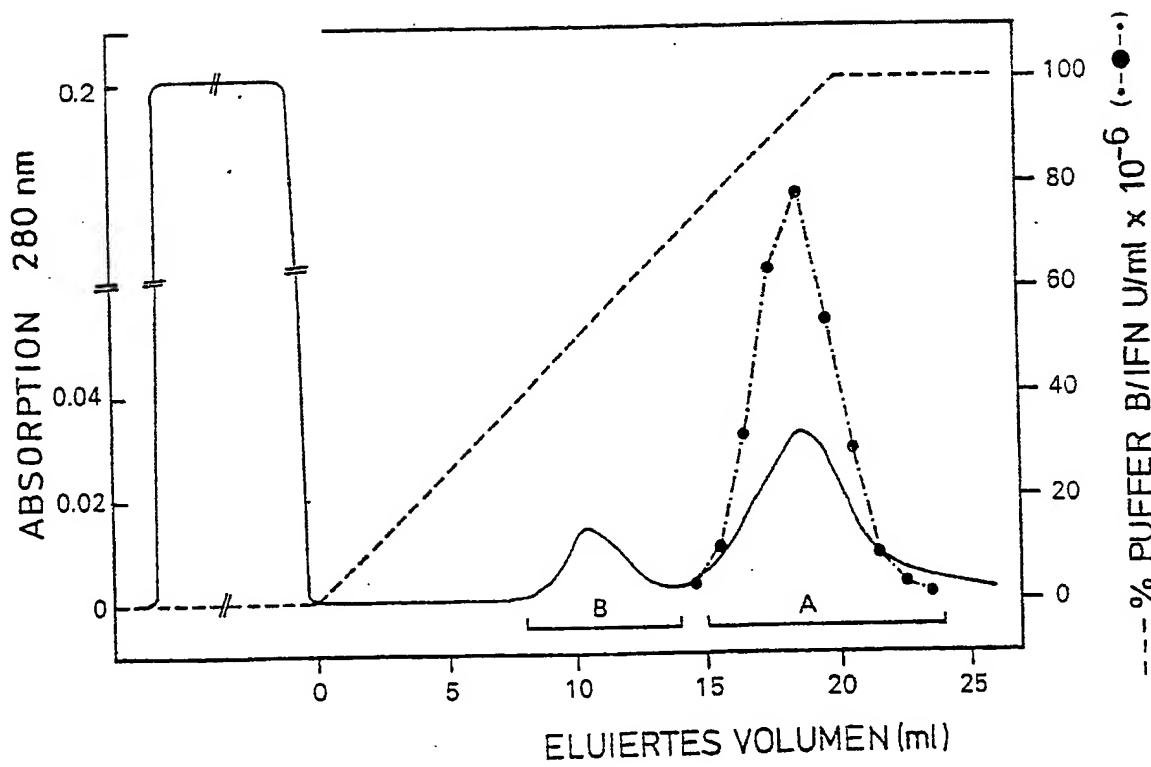
TTAACAAAA	TATTAACGTT	TACAATTCA	GGTGGCACTT	TTGGGGAAA	TGTGGCGGGAA	4680
ACCCCTATT	GTTTATTTT	CTAAATACAT	TCAAAATGTT	ATCCGGCTCAT	GAGACAATAA	4740
CCCTGATAAA	TGCTTCAATA	ATATTGAAAA	AGGAAGAGTA	TGAGTATTCA	ACATTTCGGT	4800
GTCGCCCTTA	TTCCCTTTT	TGCGGCATT	TGCCTTCCTG	TTTTTGCTCA	CCAGAAACG	4860
CTGGTGAAG	AAAAGATGC	TGAAGATCAG	TGGGTGCAC	GAGTGGTTA	CATCGAACTG	4920
GATCTAACAA	GGGTAAGAT	CCTTGAGAGT	TTTCGCCCG	AAGAACGTT	TCCAATGATG	4980
AGCAGCTTA	AAGTTCTGCT	ATGGGGCG	GTATTATCC	GTATTGACGC	CGGGCAAGAG	5040
CAACTCGGTC	GCCGCATACA	CTATTCTCAG	AATGACTGG	TTGAGTACTC	ACCAAGTCACA	5100
GAAAGCATT	TTACGGATGG	CATGACAGTA	AGAGAAATTAT	GCAGTGTGC	CATAACCATG	5160
AGTGATAACA	CTGCGCCAA	CTTACTCTG	ACAAACGATCG	GAGGACCGAA	GGAGCTAACCC	5220
GCTTTTTCG	ACAACATGGG	GGATCATGTA	ACTCGCCCTTG	ATCGTTGGGA	ACCGGAGCTG	5280
AATGAAAGCCA	TACCAAACGA	CGAGCGGTGAC	ACCACGATGC	CTGTAGCAAT	GGCAACAAACG	5340
TTGCCAAC	TATTAACCTGG	CGAACTACTT	ACTCTAGCTT	CCCGGCAACA	ATTAATAGAC	5400
TGGATGGAGG	CGGATAAAAGT	TGCAGGACCA	CTTCTGGCT	CGGCCCTTC	GGCTGGCTGG	5460
TTTATGCTG	ATAAAATCTGG	AGCCGGTGAG	CCTGGGTCTC	GGCGTATCAT	TGCAAGCACTG	5520
GCGCCAGATG	GTAAGCCCTC	CCGTATCGTA	GTATCTACA	CGACGGGGAG	TCAGGCAACT	5580
ATGGATGAAAC	GAAATAGACA	GATCGCTGAG	ATAGGTGCCT	CACTGATTAA	GCATTGGTAA	5640
CTGTCAGACC	AAGTTTACTC	ATATATACCT	TAGATTGATT	TAAAACCTCA	TTTTAAATT	5700
AAAAGGATCT	AGGTGAAGAT	CCTTTTGTAT	ATCTCATGA	CCAAATCTCC	TTAACGTGAG	5760
TTTTCTGTC	ACTGAGCGTC	AGACCCCGTA	GAAAAGATCA	AGGATCTTC	TTGAGATCCT	5820
TTTTTCTGC	GGTAAATCTG	CTGCTTGCAA	ACAAAAAAAC	CACCGCTACC	AGCGGTGGTT	5880
TGTTGCCGG	ATCAAGAGCT	ACCAACTCTT	TTTCCGAAGG	TAACTGGCTT	CAGCAGAGCG	5940
CAGATACCAA	ATACTGTCCT	TCTAGTGTAG	CCGTAGTGTAG	GCCACCCACTT	CAAGAACTCT	6000
GTAGCACCAGC	CTACATACCT	CGCTCTGCTA	ATCCTGTAC	CAGTGGCTGC	TGCCAGTGGC	6060
GATAAGTCGT	GTCTTACCGG	GTGGGACTCA	AGACGATAAGT	TACCGGGATAAA	GGGGCAGCGGG	6120
TCGGGCTGAA	CGGGGGTTTC	GTGCACACAG	CCCAGCTGG	AGCGAACGAC	CTACACCGAA	6180

19/32  
FIG. 11E

CTGAGATAACC TACAGCGTGA GCATTGAGAA AGCGCCACGC TTCCCGAAGG GAGAAAGGGCG 6240  
GACAGGGTATC CGGTAAAGCGG CAGGGTCCGG A CAGGGAGGC ACAGGAGGC GCACGAGGG GCACGAGGG GCTTCCAGGG 6300  
GGAAACGCCT GGTATCTTTA TAGTCCCTGTC GGGTTTCGCC ACCTCTGACT TGAGCGTCTGA 6360  
TTTTTGTGAT GCTCGTCAGG GGGCGGAGC CTATGGAAAA ACGCCAGCAA CGCC

20/32

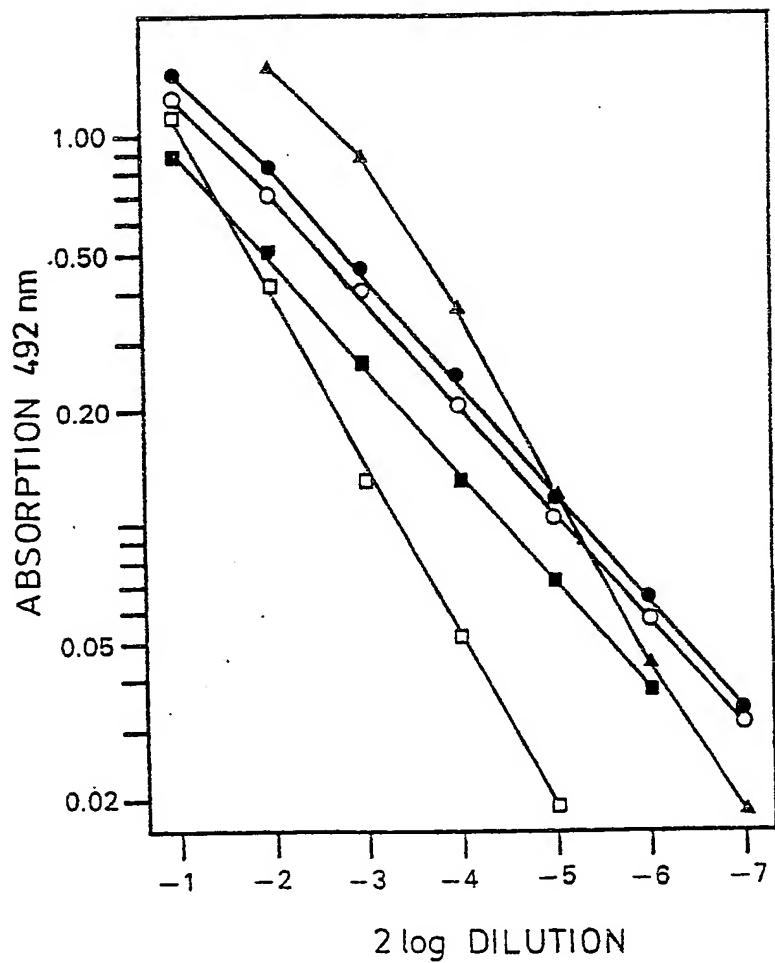
FIG.12



ERSATZBLATT

21/32

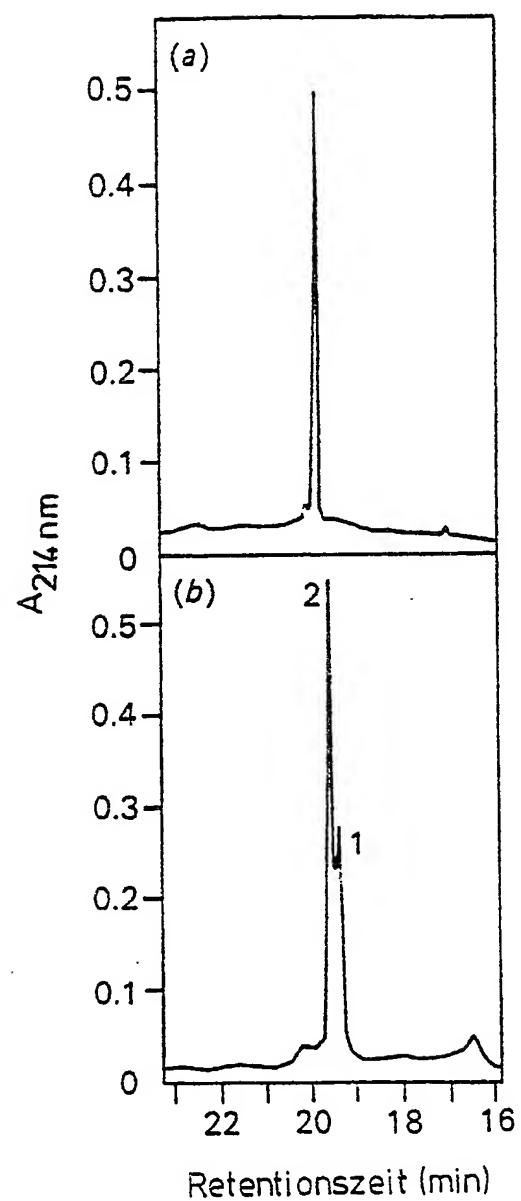
FIG.13



ERSATZBLATT

22/32

FIG. 14



ERSATZBLATT

23/32  
FIG.15

1 5 10 15  
CYS-ASP-LEU-PRO-GLN-THR-HIS-SER-LEU-GLY-SER-ARG-ARG-THR-LEU-

20 25 30  
MET-LEU-LEU-ALA-GLN-MET-ARG-ARG-ILE-SER-LEU-PHE-SER-CYS-LEU-

35 40 45  
LYS-ASP-ARG-ARG-ASP-PHE-GLY-PHE-PRO-GLN-GLU-GLU-PHE-GLY-ASN-

50 55 60  
GLN-PHE-GLN-LYS-ALA-GLU-THR-ILE-PRO-VAL-LEU-HIS-GLU-MET-ILE-

65 70 75  
GLN-GLN-ILE-PHE-ASN-LEU-PHE-SER-THR-LYS-ASP-SER-SER-ALA-ALA-

80 85 90  
TRP-ASP-GLU-THR-LEU-LEU-ASP-LYS-PHE-TYR-THR-GLU-LEU-TYR-GLN-

95 100 105  
GLN-LEU-ASN-ASP-LEU-GLU-ALA-CYS-VAL-ILE-GLN-GLY-VAL-GLY-VAL-

110 115 120  
THR-GLU-THR-PRO-LEU-MET-LYS-GLU-ASP-SER-ILE-LEU-ALA-VAL-ARG

125 130 135  
LYS-TYR-PHE-GLN-ARG-ILE-THR-LEU-TYR-LEU-LYS-GLU-LYS-LYS-TYR-

140 145 150  
SER-PRO-CYS-ALA-TRP-GLU-VAL-VAL-ARG-ALA-GLU-ILE-MET-ARG-SER-

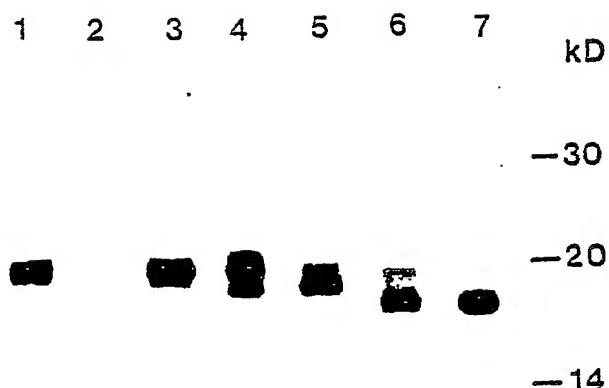
155 160 165  
PHE-SER-LEU-SER-THR-ASN-LEU-GLN-GLU-SER-LEU-ARG-SER-LYS-GLU

α2c

ERSATZBLATT

24/32

FIG. 16



ERSATZBLATT

25/32

FIG. 17

1      2  
—  
—

— 30

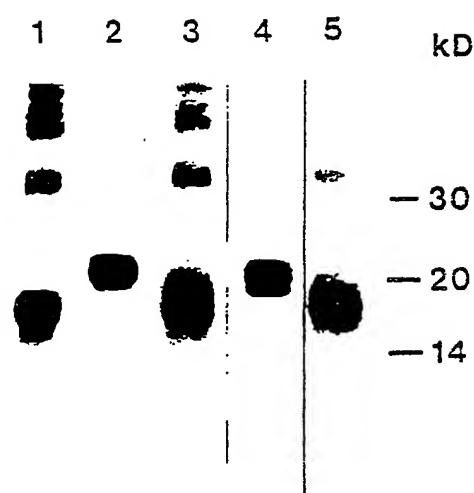
— 20

— 14

ERSATZBLATT

26/32

FIG.18



ERSATZBLATT

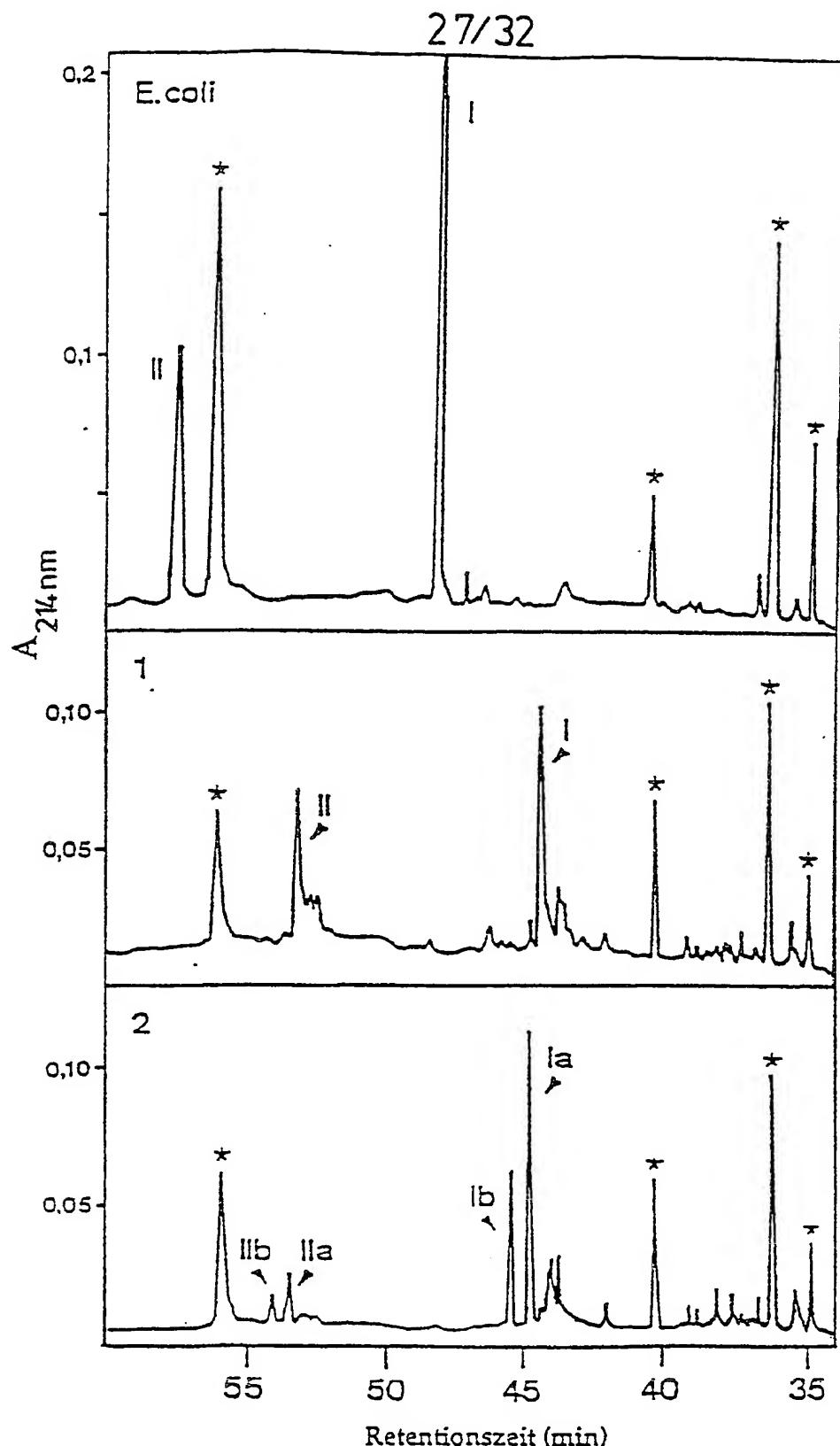
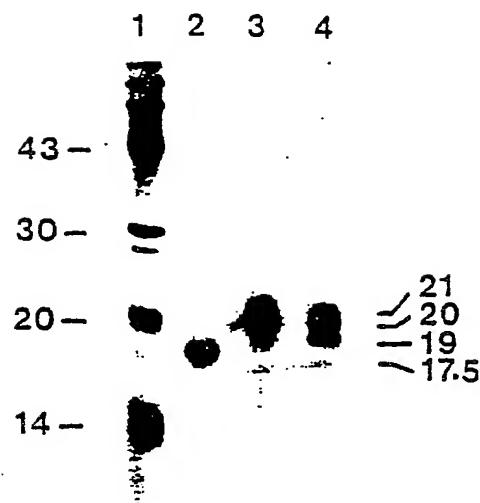


FIG. 19

ERSATZBLATT

28/32

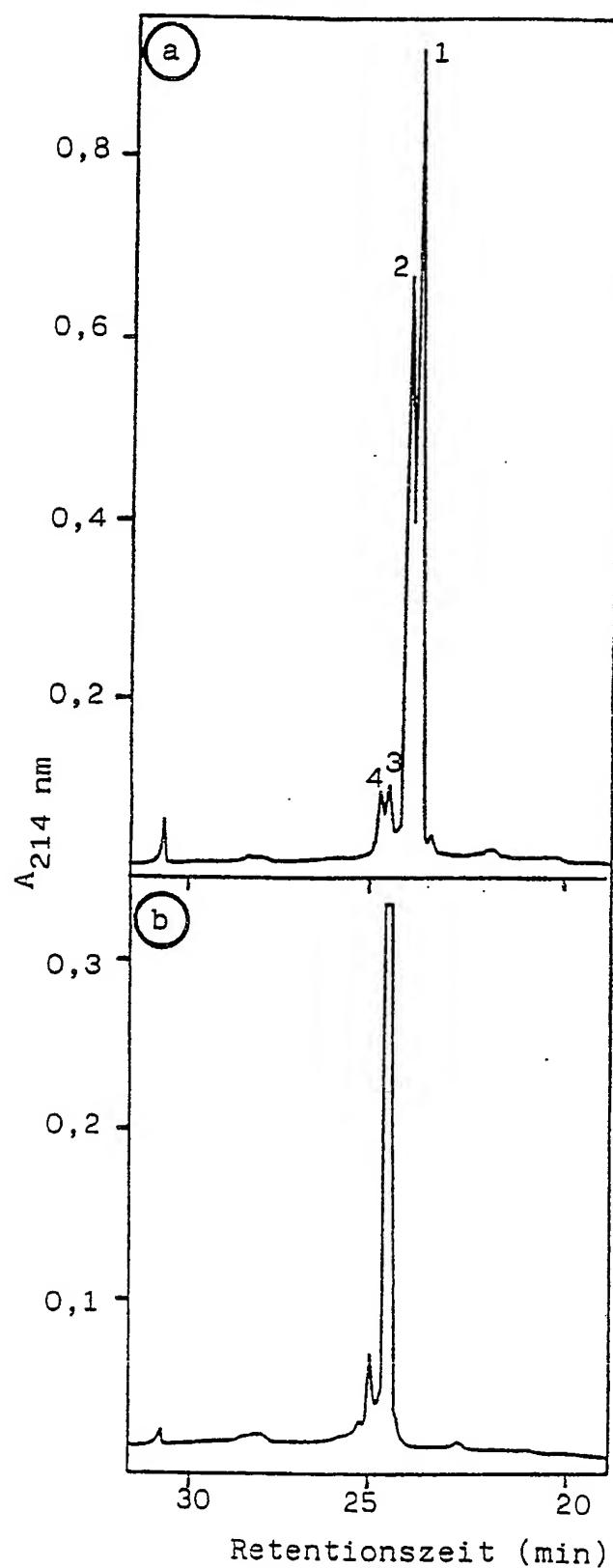
FIG.20



ERSATZBLATT

29/32

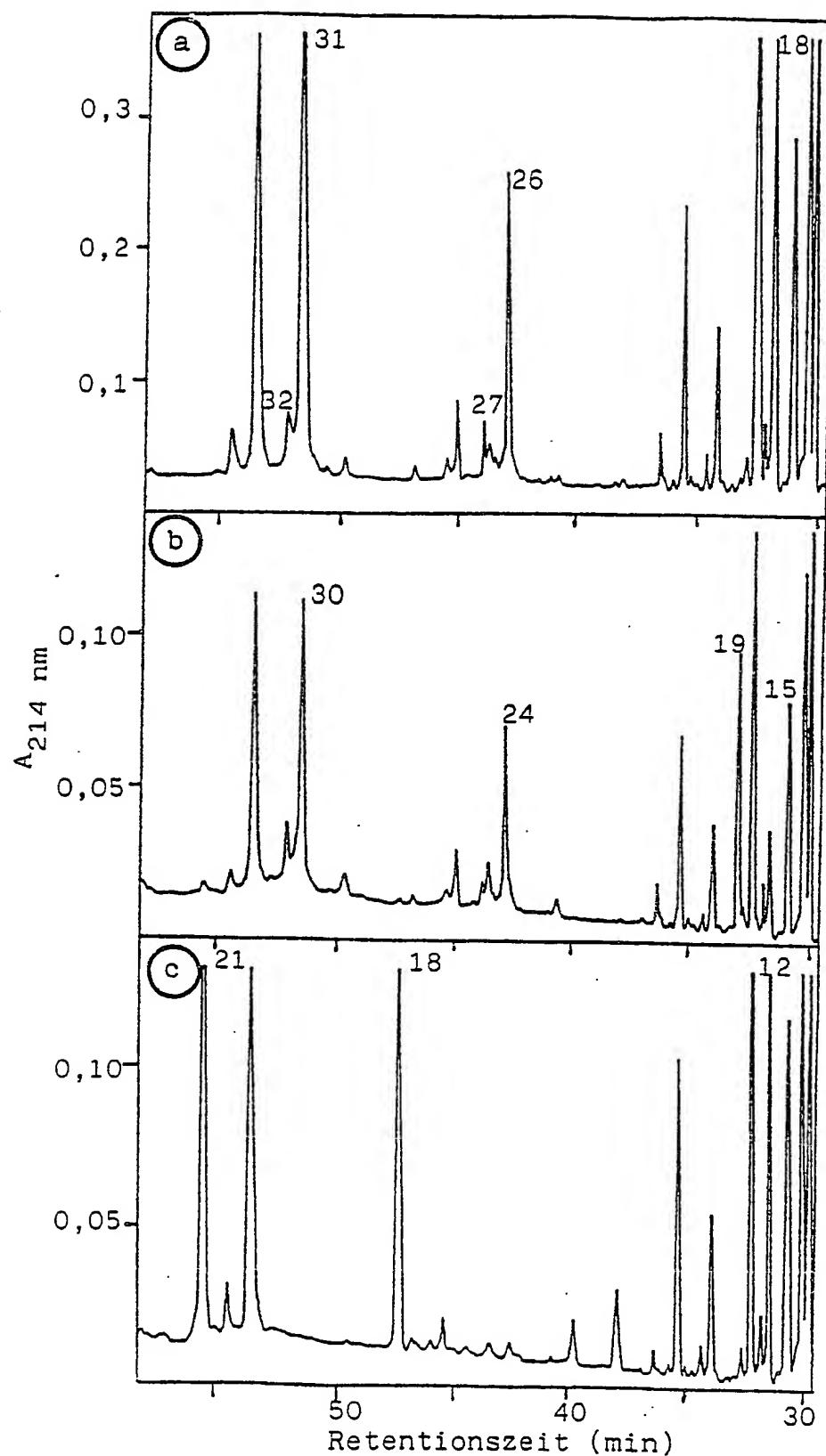
FIG. 21



ERSATZBLATT

30/32

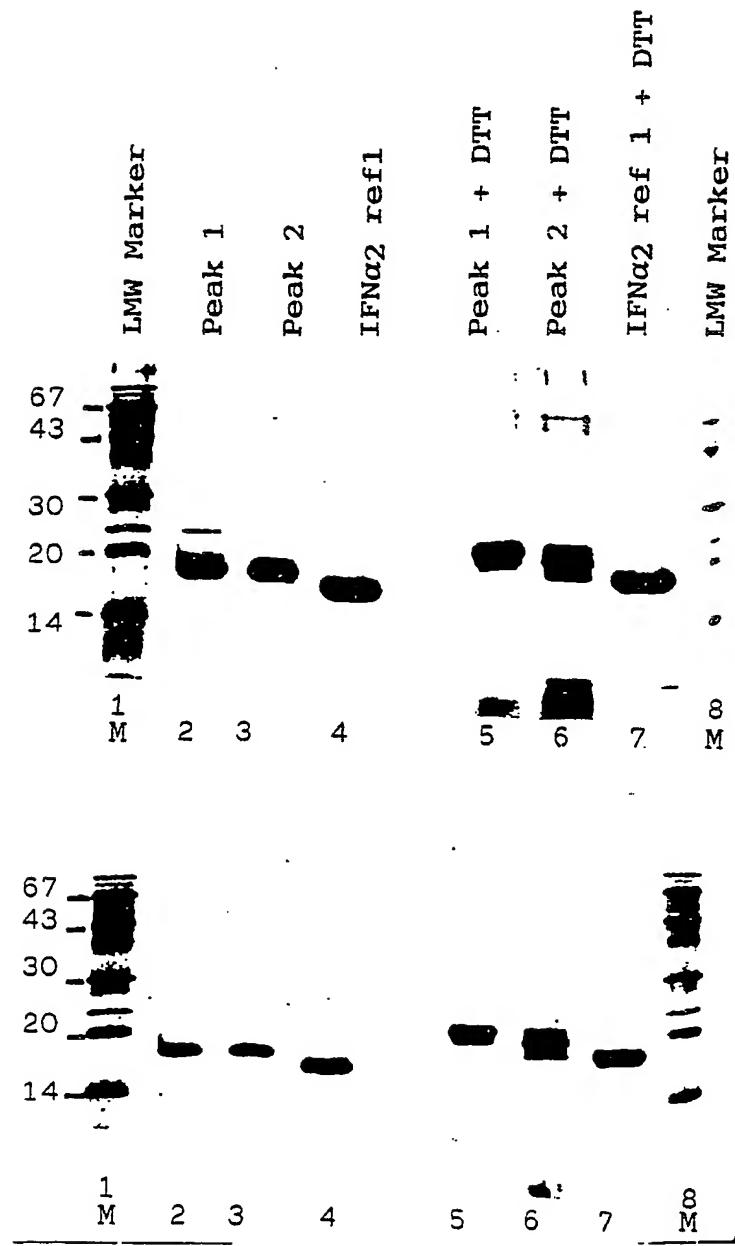
FIG. 22



ERSATZBLATT

31/32

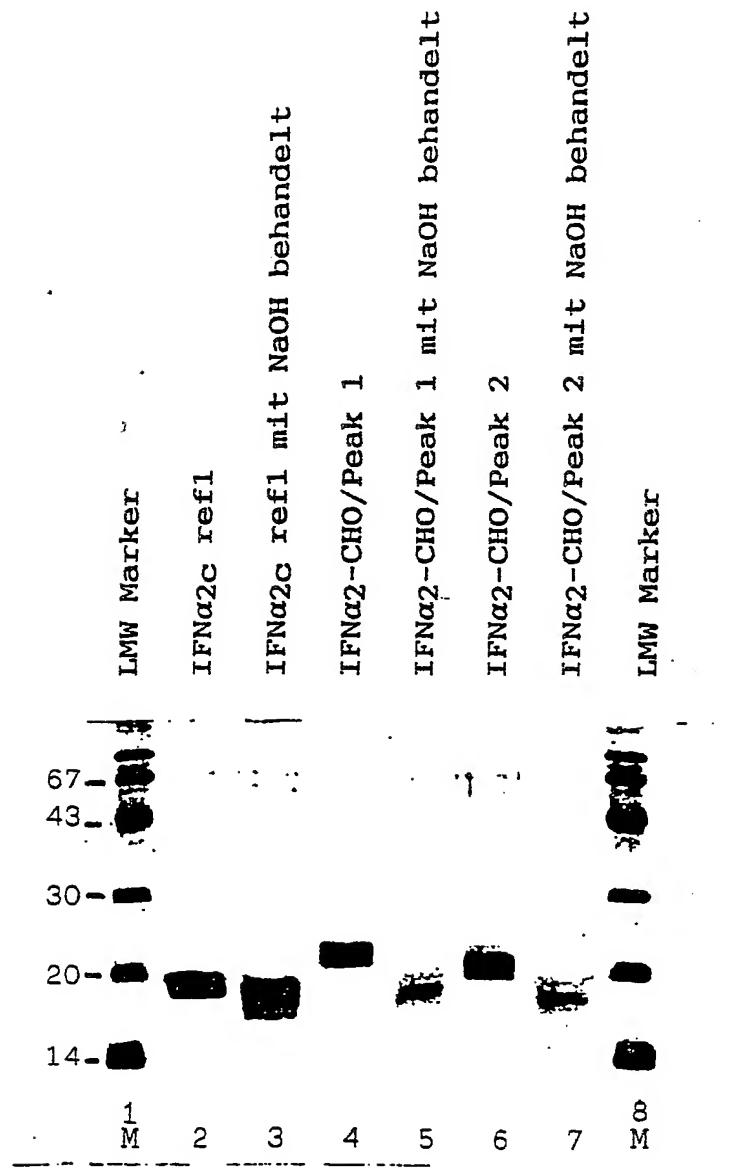
FIG. 23



ERSATZBLATT

32/32

FIG. 24



ERSATZBLATT

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 91/01266

## I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int. Cl. <sup>5</sup> C12N15/21; C12P21/02; C12P21/08; A61K37/66

## II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>

Classification System	Classification Symbols
Int. Cl. <sup>5</sup>	C07K; C12N; C12P
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>	

## III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT<sup>9</sup>

Category <sup>10</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
Y	US, A, 4 289 690 (HOFFMANN-LA ROCHE INC.,) 15 September 1981 see column 21, line 32 - line 41; tables 3,5,7	1-6,12-15
Y	JOURNAL OF INTERFERON RESEARCH vol. 9 SUP, No.2, 1989, page 184; K. ZOON ET AL: "Chemical characterization of human lymphoblastoid interferon-alpha species." see abstract	1-6,12-15
A	ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS vol. 232, No.1, July 1984, NEW YORK pages 422 - 426; JAMES E. LAEDON ET AL: "Some species of human leukocyte interferon are glycosylated." see the whole document	1-6,12-15
		-/-

\* Special categories of cited documents: <sup>10</sup>  
 "A" document defining the general state of the art which is not  
 considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international  
 filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or  
 which is cited to establish the publication date of another  
 citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or  
 other means  
 "P" document published prior to the international filing date but  
 later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date  
 or priority date and not in conflict with the application but  
 cited to understand the principle or theory underlying the  
 invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention  
 cannot be considered novel or cannot be considered to  
 involve an inventive step  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention  
 cannot be considered to involve an inventive step when the  
 document is combined with one or more other such docu-  
 ments, such combination being obvious to a person skilled  
 in the art  
 "&" document member of the same patent family

## IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

23 October 1991 (23.10.91)

Date of Mailing of this International Search Report

25 November 1991 (25.11.91)

International Searching Authority

European Patent Office

Signature of Authorized Officer

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
X	NATURE. vol. 287, 2 October 1980, LONDON GB pages 408-411; G.ALLEN ET AL: "A family of structural genes for human lymphoblastoid-leukocyte-type-inter- feron." see page 410, right-hand column; figure 2	1-6,12-15
X	WO, A, 8 300 693 (BERT, KURT, FRIMANN) 3 March 1983 see claims	1-6,12-15
X	DE, A,3 306 060 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 23 August 1984 cited in the application see examples 1,4,5	1-6
X	THE JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY vol. 68, No. 6, June 1987, COLCHESTER.GB. pages 1669-1676; G.R.ADOLF: "Antigenic structure of human interferon wl-IFN alphall I- : comparison with other human interferons." cited in the application see the whole document	1-6,12-15
A	EP, A, 158 420 (SCHERING CORPORATION) 16 October 1985 see claims	1-6
P,X	THE BIOCHEMICAL JOURNAL vol.276, No.2, 29 May 1991, COLCHESTER.GB. pages 511-518; G.R.ADOLF ET AL: "Natural interferon-alpha2 is O-glycosylated." see the whole document	1-15

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

EP 9101266  
SA 48946

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

23/10/91

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
<hr/>				
US-A-4289690	15-09-81	AU-B- 561672	14-05-87	
		AU-A- 1586683	08-12-83	
		AU-B- 535936	12-04-84	
		AU-A- 5313679	29-05-80	
		BE-A- 880201	22-05-80	
		CA-A- 1129409	10-08-82	
		CH-A- 654843	14-03-86	
		CH-A- 653347	31-12-85	
		CH-A- 658459	14-11-86	
		DE-A,C 2947134	12-06-80	
		FR-A,B 2442054	20-06-80	
		GB-A,B 2037296	09-07-80	
		LU-A- 81918	04-06-81	
		NL-A- 7908516	28-05-80	
		SE-B- 454276	18-04-88	
		SE-A- 7909721	16-06-80	
		AT-B- 367769	26-07-82	
		JP-A- 58192896	10-11-83	
		JP-B- 63038330	29-07-88	
		JP-C- 1482912	27-02-89	
		JP-A- 55094320	17-07-80	
		JP-B- 62061040	18-12-87	
		JP-A- 63164897	08-07-88	
		US-A- 4503035	05-03-85	
<hr/>				
WO-A-8300693	03-03-83	AU-A- 8820782	08-03-83	
		EP-A- 0085693	17-08-83	
<hr/>				
DE-A-3306060	23-08-84	EP-A- 0119476	26-09-84	
		JP-A- 59224687	17-12-84	
<hr/>				
EP-A-158420	16-10-85	FR-A- 2560212	30-08-85	
		US-A- 4973556	27-11-90	
<hr/>				

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP 91/01266

Internationales Aktenzeichen

I. KLASSEFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationsymbolen sind alle anzugeben)<sup>6</sup>

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

Int.Kl. 5 C12N15/21 ; C12P21/02 ; C12P21/08 ; A61K37/66

## II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE

Recherchierte Mindestpräzstoff 7

Klassifikationssystem	Klassifikationsymbole
Int.Kl. 5	C07K ; C12N ; C12P

Recherchierte nicht zum Mindestpräzstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen<sup>8</sup>III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN<sup>9</sup>

Art. <sup>10</sup>	Kenntzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Ber. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
Y	US, A, 4 289 690 (HOFFMANN-LA ROCHE INC.,) 15. September 1981. siehe Spalte 21, Zeile 32 - Zeile 41; Tabellen 3,5,7 ----	1-6, 12-15
Y	JOURNAL OF INTERFERON RESEARCH Bd. 9 SUP, Nr. 2, 1989, Seite 184; K.ZOON ET AL: 'Chemical characterization of human lymphoblastoid interferon-alpha species.' siehe Zusammenfassung ----	1-6, 12-15
A	ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS Bd. 232, Nr. 1, Juli 1984, NEW YORK Seiten 422 - 426; JAMES E. LABDON ET AL: 'Some species of human leukocyte interferon are glycosylated.' siehe das ganze Dokument ----	1-6, 12-15

<sup>6</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup> :<sup>7</sup> "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist<sup>8</sup> "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist<sup>9</sup> "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)<sup>10</sup> "O" Veröffentlichung, die sich auf eine natürliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht<sup>11</sup> "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

-/-

<sup>12</sup> "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist<sup>13</sup> "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfinung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden<sup>14</sup> "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfinung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann abwegig ist<sup>15</sup> "A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

## IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

1 23. OKTOBER 1991

Absendetermin des internationalen Recherchenberichts

25. 11. 91

Internationale Recherchenbehörde

EUROPAISCHES PATENTAMT

Unterschrift des bevoilichtigten Bediensteten

LE CORNEC N.D.R.

## III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NATURE. Bd. 287, 2. Oktober 1980, LONDON GB Seiten 408 - 411; G.ALLEN ET AL: 'A family of structural genes for human lymphoblastoid -leukocyte-type- interferon. siehe Seite 410, rechte Spalte; Abbildung 2 ---	1-6, 12-15
X	WO,A,8 300 693 (BERG,KURT,FRIMANN) 3. März 1983 siehe Ansprüche ---	1-6, 12-15
X	DE,A,3 306 060 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 23. August 1984 in der Anmeldung erwähnt siehe Beispiele 1,4,5 ---	1-6
X	THE JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY Bd. 68, Nr. 6, Juni 1987, COLCHESTER.GB. Seiten 1669 - 1676; G.R.ADOLF: 'Antigenic structure of human interferon $\alpha 1$ -IFN alphall I- : comparison with other human interferons.' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-6, 12-15
A	EP,A,158 420 (SCHERING CORPORATION) 16. Oktober 1985 siehe Ansprüche ---	1-6
P,X	THE BIOCHEMICAL JOURNAL Bd. 276, Nr. 2, 29. Mai 1991, COLCHESTER.GB. Seiten 511 - 518; G.R.ADOLF ET AL: 'Natural interferon-alpha2 is O-glycosylated.' siehe das ganze Dokument ---	1-15

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 9101266  
SA 48946

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
Diese Angaben dienen nur zur Orientierung und erfolgen ohne Gewähr.

23/10/91

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
<hr/>				
US-A-4289690	15-09-81	AU-B-	561672	14-05-87
		AU-A-	1586683	08-12-83
		AU-B-	535936	12-04-84
		AU-A-	5313679	29-05-80
		BE-A-	880201	22-05-80
		CA-A-	1129409	10-08-82
		CH-A-	654843	14-03-86
		CH-A-	653347	31-12-85
		CH-A-	658459	14-11-86
		DE-A,C	2947134	12-06-80
		FR-A,B	2442054	20-06-80
		GB-A,B	2037296	09-07-80
		LU-A-	81918	04-06-81
		NL-A-	7908516	28-05-80
		SE-B-	454276	18-04-88
		SE-A-	7909721	16-06-80
		AT-B-	367769	26-07-82
		JP-A-	58192896	10-11-83
		JP-B-	63038330	29-07-88
		JP-C-	1482912	27-02-89
		JP-A-	55094320	17-07-80
		JP-B-	62061040	18-12-87
		JP-A-	63164897	08-07-88
		US-A-	4503035	05-03-85
<hr/>				
WO-A-8300693	03-03-83	AU-A-	8820782	08-03-83
		EP-A-	0085693	17-08-83
<hr/>				
DE-A-3306060	23-08-84	EP-A-	0119476	26-09-84
		JP-A-	59224687	17-12-84
<hr/>				
EP-A-158420	16-10-85	FR-A-	2560212	30-08-85
		US-A-	4973556	27-11-90
<hr/>				

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**